

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ (3^e Cycle)
DE SCIENCES BIOLOGIQUES (Biologie Végétale)

par

Michel TROUILLOUD

Un Micro-illuminateur spectral à usages biologiques

Essais sur la caroténogenèse de quelques micro-organismes

Soutenue le 9 Juillet 1971 devant la Commission d'Examen :

R. KUHNER Président

Ph. LEBRETON	}	Examineurs
A. M. GOUNOT		
R. BERNARD		

Service de Phytochimie et Phytobiologie

U E R des Sciences de la Nature

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ (3^e Cycle)
DE SCIENCES BIOLOGIQUES (Biologie Végétale)

par

Michel TROUILLOUD

Un Micro-illuminateur spectral à usages biologiques

Essais sur la caroténogenèse de quelques micro-organismes

Soutenue le 9 Juillet 1971 devant la Commission d'Examen :

R. KUHNER Président

Ph. LEBRETON	}	Examineurs
A. M. GOUNOT		
R. BERNARD		

Service de Phytochimie et Phytobiologie

U E R des Sciences de la Nature

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ (3^e Cycle)
DE SCIENCES BIOLOGIQUES (Botanique Végétale)

par

MICHEL TROUILLOU

Un Micro-illuminateur spectral à usages biologiques

Examen sur la caroténochrome de quelques micro-organismes



Soutenue le 9 Juillet 1971 devant la Commission d'Examen :

R. KUHNEN Président

Examinateurs :
R. BERNARD
A. M. GOURNOT
R. LEBRETTON

Service de Phytochimie et Phytophysiologie

UER des Sciences de la Nature

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN

1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé.

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant.

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

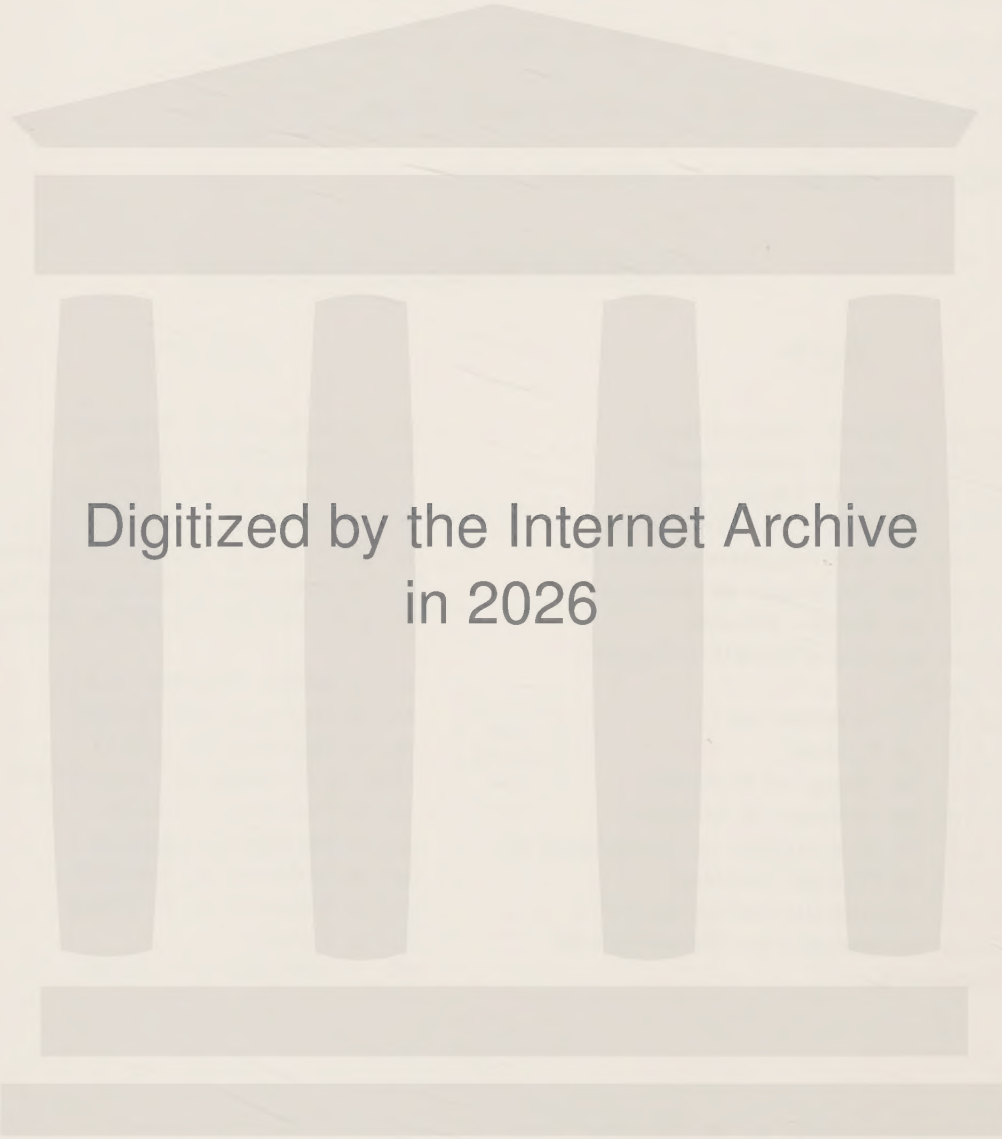
U.E.R. médicale Grange-Blanche
U.E.R. médicale Alexis-Carrel
U.E.R. médicale LYON-Nord
U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest
U.E.R. des Sciences pharmaceutiques
U.E.R. des Techniques de Réadaptation
U.E.R. de Biologie humaine
Institut Régional d'Education Physique
et Sportive
U.E.R. de Mathématiques
U.E.R. de Physique
U.E.R. de Chimie et Biochimie
U.E.R. des Sciences de la Nature
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie
U.E.R. de Physique nucléaire
Institut Universitaire de Technologie I
Institut Universitaire de Technologie II
Observatoire

DIRECTEURS

M. le Professeur D. GERMAIN
M. le Professeur C. GIROD
M. le Professeur A. BERTOYE
M. le Professeur L. TOLOT
M. M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé
M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN
M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé

M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.
M. le Doyen J. BRACONNIER
M. le Professeur M. DUFAY
Mlle le Professeur D. GAUTHERON
M. le Professeur L. DAVID
M. le Professeur J. CHANEL
M. le Professeur A. SARAZIN
M. le Professeur L. FEUVRAIS
M. J. GALLET
M. le Professeur J.H. BIGAY

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552625_0006

UN MICRO-ILLUMINATEUR SPECTRAL A USAGES BIOLOGIQUES

Essais sur la Caroténogenèse de quelques micro-organismes

C'est à la suite d'un Diplôme d'études approfondies de photobiologie que Monsieur le Professeur LEBRETON nous a proposé de mettre au point un appareillage permettant d'étudier l'influence de la lumière sur la physiologie des végétaux ; si, dès le départ, l'idée nous a paru séduisante, cette étude nous a intéressé d'autant plus qu'elle se précisait davantage.

Comme beaucoup de Sciences récentes, la photobiologie se trouve être un carrefour de diverses disciplines, par les différents niveaux où intervient le facteur lumière dans le phénomène vivant. A l'échelle de l'organisme, ce sont essentiellement la physiologie et l'optique qui sont impliquées ; si nous descendons d'un degré dans l'organisation du vivant, c'est à la biologie moléculaire et à la phytochimie que l'on a recours. Du point de vue pratique, la biochimie, qui permet de quantifier les résultats, est un mode d'expression. Enfin, l'insertion dans la réalité de toute étude photobiologique fait appel à la technologie, et le plus bel exemple en est certainement le Phytotron de Gif-sur-Yvette.

Le domaine de la photobiologie qui nous intéresse plus particulièrement, celui du déterminisme de la pigmentation des micro-organismes, relève de toutes ces Sciences. La très grande diversité chimique des pigments élaborés par les micro-organismes nous a obligé à effectuer un choix : nous ne relaterons dans notre exposé que les seules recherches relatives à la caroténogénèse.

Nous voulons remercier respectueusement Monsieur le Professeur R. KÜHNER pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail, malgré l'importance et la multiplicité de ses tâches, et pour l'honneur qu'il nous a accordé en acceptant de présider notre Jury de Thèse.

Notre profonde gratitude va à Monsieur le Professeur Ph. LEBRETON, qui nous a accueilli dans son Laboratoire et nous a donné le point de départ de ce travail : qu'il soit remercié pour ses conseils pertinents et pour l'ambiance sympathique de travail qu'il sait entretenir dans son Equipe de Recherche.

Nous prions Mademoiselle A.M. GOUNOT, Maître de Conférences en Microbiologie, de trouver ici l'expression de notre vive reconnaissance : elle nous a apporté de précieux enseignements pratiques.

Nous exprimons tous nos remerciements à Monsieur R. BERNARD, Maître-Assistant en Optique, pour le temps qu'il nous a accordé et les conseils qu'il nous a donnés : nous avons constamment eu recours à lui pour les problèmes d'Optique qui se sont posés au cours de ce travail.

Nos remerciements les plus vifs vont à Monsieur N. ARPIN, Maître-Assistant en Biologie Végétale, qui a su nous faire partager son enthousiasme du travail de recherche et a

consacré beaucoup de son temps à nous conseiller et à nous guider.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à Monsieur J.L. FIASSEON : travaillant sur des sujets voisins, nous avons apprécié sa sollicitude discrète et ses conseils amicaux.

Pour l'amitié ou l'aide matérielle qu'ils nous ont apportées à un moment ou à un autre de notre travail, nous remercions tous nos collègues du Laboratoire de Phytochimie et Phytobiologie ; nous ne voulons pas oublier Monsieur MOURAVIEFF, Maître de Recherches au C.N.R.S., dont nous avons mis à contribution tant la compétence que le matériel de Photobiologie, Monsieur REYMANN, pour le dessin industriel de notre chambre d'irradiation, Mademoiselle POTTU, du Centre de Microscopie électronique appliquée à la Biologie, et toute l'équipe d'Ecologie, particulièrement Madame AVENAS et Monsieur MOIROUD, pour les conseils et l'aide qu'ils ont apportés au microbiologiste novice : que tous trouvent ici l'expression de nos sincères remerciements.

Enfin, nous ne saurions oublier de remercier les Etablissements SARGET sans la généreuse aide financière desquels ce travail n'aurait pas été possible.

PREMIERE PARTIE

Exposé bibliographique

sur le déterminisme exogène

de la caroténogénèse chez les micro-organismes

CHAPITRE I

Rôle des facteurs autres que la lumière dans le déterminisme de la caroténogénèse

Les premiers travaux qui font date dans le domaine du déterminisme de la caroténogénèse des micro-organismes sont ceux de ZALOKAR (1954, 1955 et 1957) ; cet auteur a montré que chez Neurospora crassa, la pigmentation en caroténoïdes est sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs :

- facteurs physiques : température et lumière
- facteurs chimiques : oxygène, métabolites, inhibiteurs
- facteur physico-chimique : pH.

A/ Les Conclusions essentielles de ZALOKAR

- Les cultures mycéliennes de Neurospora crassa réclament obligatoirement pour pigmenter un stimulus lumineux.
- L'induction de la pigmentation peut être réalisée par un bref éclair lumineux suivi d'une incubation à l'obscurité ; la quantité de caroténoïdes produite est alors sensiblement la même que dans le cas d'une incubation en lumière continue.
- La présence de l'oxygène pendant l'illumination, comme pendant l'incubation à l'obscurité, s'avère indispensable.
- Certains métabolites défavorisent la pigmentation (c'est le cas des peptones, ou de la valine et de la leucine lorsque ces deux acides aminés représentent la seule source d'azote), d'autres sont indifférents (c'est le cas de l'extrait de levure et de la plupart des acides aminés), d'autres, enfin, la favorisent (le glycolle, par exemple, capable de restaurer une production pigmentaire ralentie par la présence des peptones).
- Il est possible d'inhiber spécifiquement la caroténogénèse par l'addition de diphénylamine au milieu de culture avant ou après l'induction lumineuse.
- La plupart des inhibiteurs enzymatiques de la respiration demeurent sans effet sur la production pigmentaire.

B/ Les facteurs de milieu autres que la lumière

A la suite de ZALOKAR, véritable pionnier de la physiologie pigmentaire des micro-organismes, divers auteurs ont approfondi et précisé les modes d'action des facteurs du milieu sur la pigmentation ; ce sont principalement trois auteurs américains, MATHEWS, RILLING et

BATRA d'une part, un auteur allemand, RAU, d'autre part, les premiers travaillant sur deux espèces de Mycobacterium, le dernier sur un Champignon, Fusarium aquaeductuum.

Après avoir vérifié la validité des conclusions de ZALOKAR, ils se sont attachés à démontrer le mécanisme régulateur de l'induction, principalement à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de telle ou telle voie métabolique et en réalisant des spectres d'action de la lumière sur la pigmentation.

Plutôt qu'une bibliographie exhaustive du problème, nous avons voulu réaliser une mise au point axée sur l'aspect photobiologique : nous passerons d'abord en revue l'ensemble des facteurs intervenant dans le déterminisme de la caroténogénèse, à l'exception du facteur lumière auquel nous consacrerons un chapitre spécial.

1° Influence de la température

D'après MATHEWS (1963), ce facteur n'a pas le même rôle pendant et après l'induction lumineuse : l'auteur prélève des lots de bactéries (Mycobacterium marinum) en phase exponentielle de croissance à l'obscurité et les illumine à deux températures différentes, + 5°C et + 30°C ; au cours de l'incubation qui suit, les bactéries pigmentent normalement à 30°C mais elles restent incolores à 5°C. Pourtant, si une aliquote de la suspension bactérienne induite à 5°C est mise à incuber à 30°C, on voit apparaître une pigmentation normale.

Une autre expérience, relatée par RILLING (1962), consiste à induire les bactéries (Mycobacterium sp.) à quatre températures très différentes (+ 30°C, 0°C, -15°C et - 78°C). Pourvu que l'incubation soit faite ensuite à +30°C, l'induction est suivie d'une pigmentation pour les quatre essais.

Il y a donc deux phases distinctes : la première, de nature photochimique, indépendante de la température ; la deuxième, de nature chimique, est thermosensible.

Il faut mentionner ici le cas particulier des micro-organismes psychrophiles comme Arthrobacter glacialis (MOIROUD et GOUNOT, 1969), capables de pigmenter dans la glace. Chez ces micro-organismes, la photo-induction comme la fabrication des caroténoïdes se font à des températures voisines de 0°C : cependant la croissance des psychrophiles strictes, et par suite la pigmentation, se trouvent fortement perturbées, voire inhibées, à +20°C. De tels organismes disposent de systèmes enzymatiques actifs dans une gamme de température notablement abaissée, expliquant leur labilité aux températures favorables aux mésophiles.

2° Influence du pH sur la pigmentation (chez les Mycobacterium)

Elle est démontrée par RILLING (1962) chez Mycobacterium sp., cultivée en milieu liquide avec des tampons de pH variés : la caroténogénèse, optimale entre pH 8 et 10, diminue en milieu neutre ou acide (pH égal ou inférieur à 7). BATRA et RILLING (1964) précisent que les pH acides sont inhibiteurs au moment même de la photo-induction, par rapport à des lots témoins affrontés à ces pH pendant les trente minutes qui précèdent ou qui suivent l'illumination.

Enfin, BATRA, GLEASON et JENKINS, (1969), observent que l'incubation à pH acide (5) de suspensions de M. marinum, préalablement illuminée à pH optimum, conduit à une caroténogénèse quatre fois moins importante qu'au pH optimum.

3° Rôle de l'oxygène

Tous les auteurs cités s'accordent à reconnaître que l'oxygène est un facteur indispensable au cours du processus de pigmentation : ils ont par contre des opinions divergentes quant à son rôle exact.

RILLING (1962), (planche 1, tableau I) chez Mycobacterium sp. et MATHEWS (1963) chez M. marinum, montrent que la présence de l'oxygène est nécessaire durant les deux

PLANCHE 1

TABLEAU 1
d'après RILLING, (1962)

Influence de la nature de la phase gazeuse, au cours de
l'illumination et de l'incubation sur la caroténogénèse de
Mycobacterium sp.

Phase gazeuse au cours de		Caroténoïdes (μ g par flacon)
15 min. d'illumination	6 h. d'incubation à +30°C	
O ₂	Air	9,2
O ₂	N ₂	1,4
N ₂	Air	1,4
N ₂	N ₂	1,5

TABLEAU II
d'après RILLING, (1964)

Influence de la nature de la phase gazeuse au cours d'une
période d'incubation à l'obscurité précédant l'illumination
(Mycobacterium sp.)

Flacon	1	2	3	4
Atmosphère de préincubation	O ₂	O ₂	N ₂	N ₂
Atmosphère d'illumination	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂
μ g de caroténoïdes synthétisés par flacon	20	0,7	20	0,8

PLANCHE 2

TABLEAU III

d'après BATRA et RILLING, (1964)

Inhibition de la photo-induction de M. marinum et
M. species par l'azide et l'hydrosulfite en fonction
du pH

Organisme	Inhibiteur	pH au cours de la photo-induction	Caroténoides ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$)		% Inhibition
			Inhibiteur ajouté avant la photo-induction	Inhibiteur ajouté après la photo-induction	
<u>M. marinum</u>	Azide (10^{-2} M.)	8,0	15,8	16,0	0
"	"	5,5	8,4	12,8	34
"	"	3,0	3,1	7,4	58
"	Hydrosulfite (10^{-2} M.)	8,0	15,3	14,9	0
<u>M. species</u>	Azide (10^{-2} M.)	8,0	39,6	40,6	0
"	"	5,5	31,2	36,8	15
"	"	3,0	7,4	14,2	48
"	Hydrosulfite (10^{-2} M.)	8,0	2,3	16,2	86
"	Hydrosulfite (10^{-3} M.)	8,0	4,7	17,7	73

phases d'illumination et d'incubation, mais RILLING (1964), (planche I, tableau II), précise qu'une préincubation sous oxygène avant l'illumination sous azote n'est pas suffisante pour induire la pigmentation.

Deux hypothèses se présentent déjà quant au mode d'action de ce facteur : ou bien il intervient au cours d'une photo-oxydation, dont le produit est un métabolite directement actif, ou bien il agit comme accepteur d'électrons, en maintenant un composé dans un état d'oxydation définie. RILLING penche pour la première hypothèse, d'après l'expérience précédemment citée et en s'appuyant en outre sur les constatations suivantes

- le cyanure inhibe la respiration chez ces bactéries en empêchant la participation de l'oxygène à la chaîne respiratoire, mais ne gêne pas la photo-induction,
- on ne peut pas remplacer l'oxygène par un accepteur d'électrons comme le ferricyanure de potassium pendant la photo-induction bien que ce composé puisse jouer ce rôle de façon satisfaisante pour les bactéries mises en anaérobiose.

Pour RAU (1969), au contraire, l'oxygène ne participe pas directement à la réaction photochimique primaire chez Fusarium aquaeductuum, comme le montre l'expérience suivante : le champignon, éclairé une première fois en présence d'azote, puis oxygéné au cours d'une phase obscure, est enfin illuminé avec ou sans oxygène ; dans les deux cas, l'induction est réalisée. De cette expérience, il déduit que l'oxygène fonctionne bien comme accepteur d'électrons. En outre, tout récemment (1970), le même auteur utilise des réducteurs tels que dithionite et hydroxylamine, pour déterminer si des réactions rédox interviennent dans les premières étapes de la photo-induction : ces composés se révèlent effectivement inhibiteurs de la photophase, en réduisant les produits photo-oxydés.

En définitive, les expériences décrites ci-dessus étaient chacune des deux hypothèses ; il n'est donc pas possible, semble-t-il, de déterminer un mécanisme général d'action de l'oxygène, s'appliquant à des micro-organismes, taxinomiquement très éloignés, mais possédant néanmoins, comme nous le verrons plus loin, des photorécepteurs dont les spectres d'action sont étrangement ressemblants. Le schéma expérimental décrit par RAU, appliqué à Mycobacterium sp., apporterait toutefois des indications intéressantes à ce sujet.

4° Les inhibiteurs de la caroténogénèse

De nombreux inhibiteurs de la caroténogénèse sont maintenant connus ; l'action anticaroténogénétique de la diphénylamine est citée par TURIAN dès 1950 chez une bactérie, puis par ZALOKAR (1955) chez N. crassa et enfin par TURIAN et SCHOPFER (1960) chez une algue. Chez N. crassa, ce composé est capable de stopper la formation des polyènes colorés, sans altérer celle des carotènes incolores (phytoène et phytofluène). Son action est également citée par RILLING (1962).

BATRA et RILLING (1964) pour leur part, ont trouvé des inhibiteurs spécifiques de la photo-induction chez deux espèces de Mycobacterium : l'azide et l'hydrosulfite. Le second n'agit d'ailleurs que chez une espèce (Mycobacterium sp.). L'action du premier varie de plus en fonction du pH et l'inhibition n'est vraiment nette qu'à pH acide (planche 2, tableau III) ; or ce composé est connu pour former des complexes avec les ions métalliques à pH acide ; les auteurs en concluent qu'au cours de la photo-induction, il pourrait y avoir intervention d'un ion métallique. N'oublions pas cependant que, chez les espèces étudiées, le pH acide à lui seul ralentit fortement le processus pigmentaire dans son ensemble.

Pour RAU (1970), comme nous l'avons vu plus haut, dithionite et hydroxylamine sont des inhibiteurs spécifiques de la photo-induction : ils réduiraient les produits oxydés de la photo-réaction.

Les inhibiteurs de la synthèse protéique, pour leur part, stoppent totalement la caroténogénèse : cet effet, extrêmement net, a permis de montrer (RILLING, 1962) que la fabrication des caroténoïdes se trouve obligatoirement précédée par une synthèse d'enzymes de novo (planche 3, courbe 1). Avec le chloramphénicol, la puromycine et la dihydrostreptomycine, les taux d'inhibition de la pigmentation varient de 93 à 99 % lorsque ces composés sont ajoutés au moment de l'induction lumineuse. De plus (BATRA et RILLING, 1964), ces pourcentages diminuent au fur et à mesure qu'augmente l'intervalle de temps séparant l'addition des inhibiteurs au milieu de culture, de la photo-induction ; passé un délai de quatre heures, leur action s'annule chez M. marinum.

Ce délai, au cours duquel s'élaborent les enzymes de la caroténogénèse, correspond à la période de latence observée dans toutes les courbes de pigmentation en fonction du temps (planche 3, courbe 2). Comme le montre le schéma de biosynthèse des protéines (planche 4, figure 1), le chloramphénicol et le puromycine bloquent la traduction de l'A.R.N. messenger sur les ribosomes, alors que la proflavine, agissant antérieurement, empêche la transcription de l'A.D.N. en A.R.N. messenger ; or cet inhibiteur a le même effet sur la pigmentation que la puromycine ou le chloramphénicol. Des expériences du même genre chez Fusarium aquaeductuum, avec l'actidione comme inhibiteur de la synthèse protéique, conduisent RAU à des conclusions identiques. Le mécanisme d'induction fait donc intervenir une régulation au niveau de l'A.D.N. lui-même et le schéma suivant peut être proposé :

- une première phase, qui est une photoréaction en présence d'oxygène,
- dans une deuxième phase, le composé formé, correspondant soit à un répresseur inactivé, soit à un activateur provoque la synthèse des enzymes de la caroténogénèse,
- dans une troisième phase a lieu la synthèse des pigments : cette phase se caractérise par son insensibilité aux inhibiteurs de la synthèse protéique.

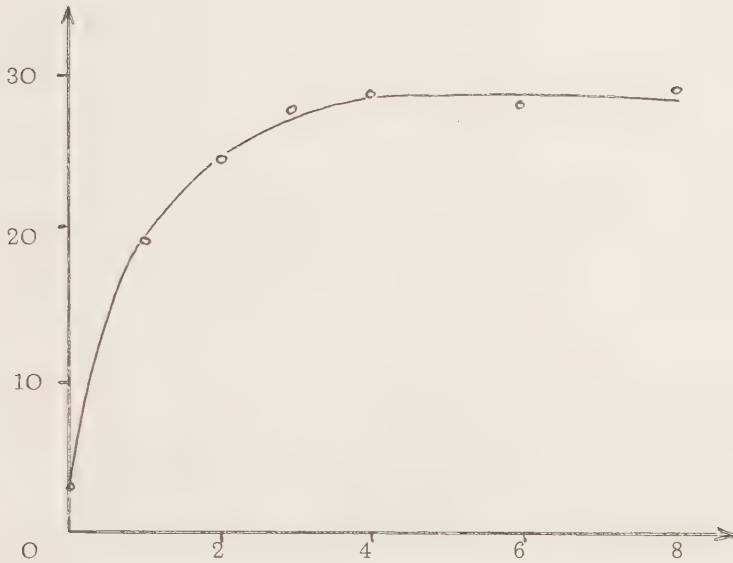
5° Les composants du milieu de croissance

Nous ne citerons que pour mémoire le rôle des composants du milieu de croissance sur la caroténogénèse, renvoyant le lecteur aux publications de RILLING et de BATRA relatant l'effet de divers sucres et d'un grand nombre de sels sur la pigmentation de Mycobacterium sp. . Chez M. marinum, MATHEWS (1963) montre que la quantité de pigments formés diminue de moitié sur un substrat déplétif : la pigmentation retrouve sa valeur normale si on ajoute au milieu de culture des acides aminés et elle double par addition d'une source de carbone convenable, comme le glycérol. Il y a d'ailleurs une relation entre la nature et la concentration des substrats d'une part, et la caroténogénèse d'autre part, selon la façon dont est donnée l'induction : l'exigence d'azote s'avère plus grande en lumière continue qu'après une brève illumination. BATRA interprète cette exigence par une synthèse protéique accrue : la fabrication des enzymes de la caroténogénèse.

Caroténoïdes $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ de poids sec

COURBE 1

d'après BATRA et RILLING (1964)



Délai d'addition du chloramphénicol en heures

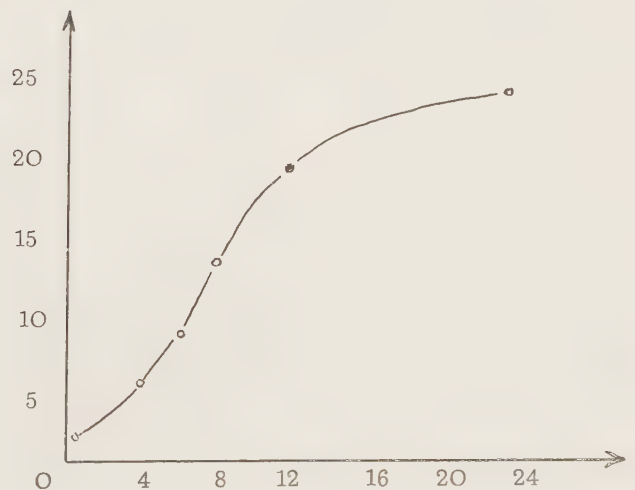
Effet du chloramphénicol sur la caroténogénèse de Mycobacterium marinum : les bactéries reçoivent 700 foot-candles de lumière à 0°C pendant 15 min. L'abscisse indique la durée de l'intervalle séparant la fin de l'illumination, de l'addition au milieu du chloramphénicol

COURBE 2

d'après BATRA et RILLING, (1964)

Synthèse des caroténoïdes par M. marinum en fonction du temps d'incubation : les bactéries reçoivent 700 foot-candles de lumière à 0°C pendant 15 min. L'abscisse indique la durée de l'incubation à l'obscurité et à $+30^\circ \text{C}$ suivant l'illumination.

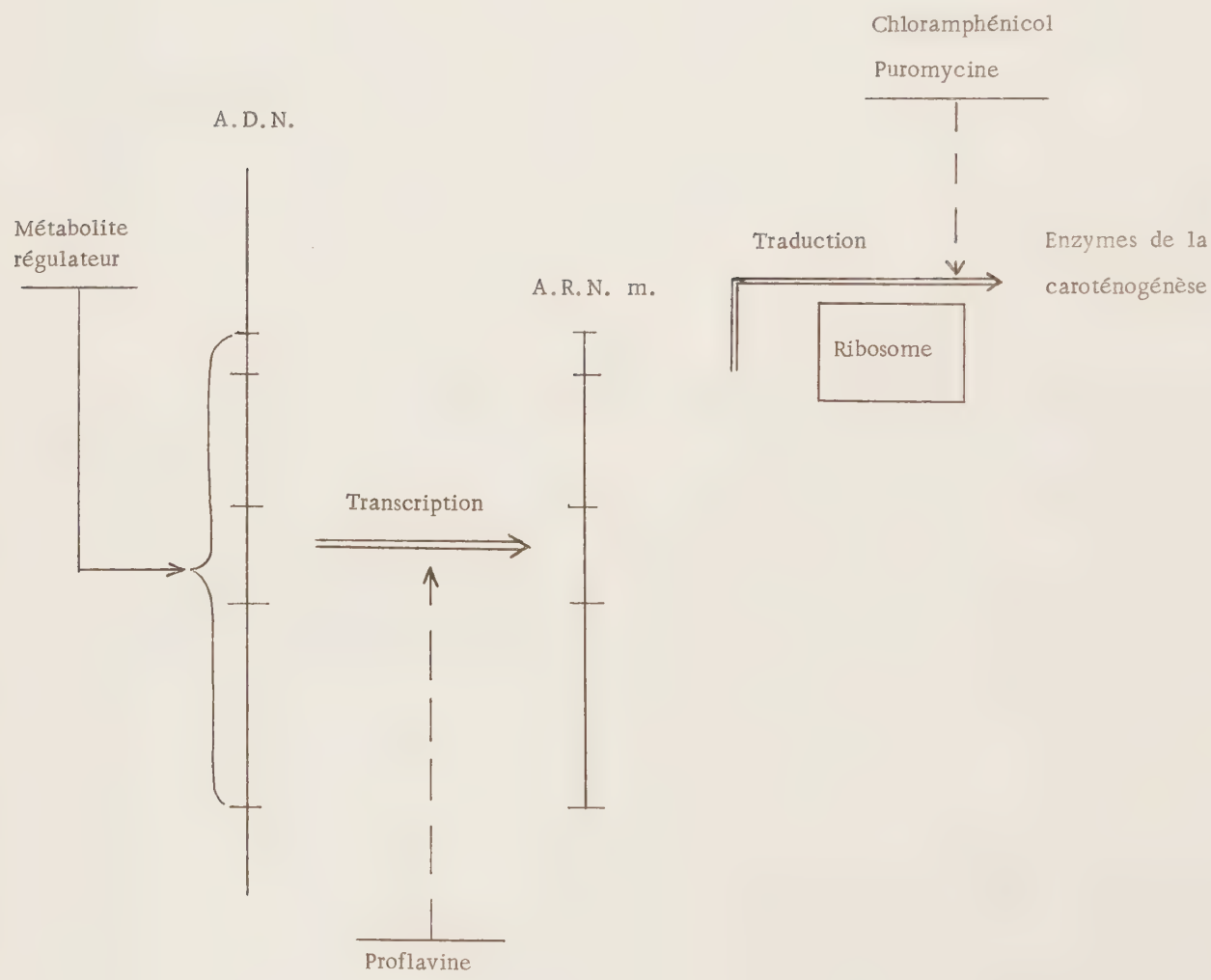
Caroténoïdes $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ de poids sec



Durée d'incubation en heures

FIGURE 1

Schéma simplifié de la biosynthèse des protéines, appliqué au cas des enzymes de la caroténogénèse, montrant les niveaux d'intervention de différents inhibiteurs



CHAPITRE II

Le rôle de la lumière dans la caroténogénèse des micro-organismes

Nous venons de discuter rapidement des différents facteurs qui interviennent en même temps que la lumière dans le déterminisme de la caroténogénèse : étudions maintenant le facteur initiateur, la lumière.

La lumière a un certain nombre de points d'impact sur les micro-organismes ; outre son rôle fondamental comme source énergétique pour les espèces photosynthétiques, elle exerce diverses fonctions chez les micro-organismes photosynthétiques ou non. En effet, elle intervient comme facteur inducteur, de la pigmentation ou de la sporulation par exemple, ou comme facteur régulateur de croissance (rythmes circadiens de croissance de certains champignons) ou de fructification (MANACHERE, 1969).

En ce qui concerne la pigmentation, nous distinguerons les micro-organismes photosensibles, chez lesquels la lumière influe, positivement ou négativement, sur la caroténogénèse, de ceux qui sont indifférents vis à vis de ce facteur.

Quant à l'importance relative des deux types de sensibilité, le nombre des genres étudiés n'est pas encore très grand. Nous citerons toutefois les travaux de MULDER et de ses collaborateurs (1966), d'après lesquels, sur 82 souches appartenant à une dizaine d'espèces différentes de Brevibacterium et de bactéries corynéformes, 32, représentant 5 espèces, se sont révélées photosensibles.

La lumière a une autre influence : les mêmes auteurs font remarquer que chez certaines souches étudiées, photosensibles ou indifférentes, pigmentées ou non, la lumière provoque une diminution du rendement en poids des colonies par rapport à des témoins gardés à l'obscurité.

Ceci est à rapprocher des travaux antérieurs de MATHEWS, qui, dès 1963, a étudié cette influence chez Mycobacterium marinum et montré que les caroténoïdes, en absorbant dans le même domaine spectral que certains composés indispensables à la survie des cellules, comme les cytochromes et les flavines, les protègent des photo-oxydations léthales. Ces oxydations peuvent être réalisées par des photorécepteurs exogènes, comme le bleu de toluidine. L'auteur suit la croissance de quatre lots de bactéries soumis aux traitements suivants :

- 1er lot : 10 000 lux (environ 100 W/m²) en présence de bleu de toluidine et de diphénylamine,
- 2ème lot : 10 000 lux en présence de diphénylamine seulement,
- 3ème lot : 10 000 lux en présence de bleu de toluidine seulement,

4ème lot : pas d'illumination et présence de bleu de toluidine et de diphénylamine.

Après un même temps d'incubation, tous les lots montrent une croissance normale, à l'exception du premier, dans lequel la diphénylamine a inhibé la pigmentation, rendant les bactéries sensibles à la photo-oxydation par le bleu de toluidine.

D'après le même auteur, la localisation des caroténoïdes dans l'enveloppe cellulaire de la bactérie ne fait que renforcer l'idée d'un "bouclier photoprotecteur".

BURCHARD et ses collaborateurs (1966 et 1969) ont également étudié cette influence inhibitrice de croissance de la lumière chez Myxococcus xanthus et prouvé que les spectres d'action de la lyse cellulaire et de la caroténogénèse sont identiques : il s'agit, d'après les auteurs, de deux processus compétitifs qui ont leur origine dans une même photoréaction, l'orientation de la réponse du micro-organisme semblant liée à l'âge de la colonie.

A/ Les différents types d'exigences en lumière

Nous en distinguerons trois :

1° Exigence partielle

La production de pigments à l'obscurité n'est pas négligeable : elle peut atteindre le tiers de la production potentielle. Comme exemple nous citerons Sporidiobolus johnsonii, Arthrobacter glacialis (pour ces deux espèces, cf. la troisième partie) et Phycomyces blakesleeanus (GARTON et coll., 1951).

Selon THEIMER et RAU (1970), cette synthèse à l'obscurité serait sous la dépendance d'un mécanisme particulier ("dark system"), inhibé par la lumière.

2° Exigence absolue

A l'obscurité, le micro-organisme ne produit que des traces de pigments et se limite le plus souvent à la synthèse des précurseurs incolores de ces derniers. Comme représentants de ce type de sensibilité, notons entre autres :

- Mycobacterium sp. et M. marinum (RILLING, MATHEWS et BATRA, 1962, 1963 et 1964)
- Arthrobacter sp. (⌘) (voir la troisième partie)
- Neurospora crassa (ZALOKAR, 1954)
- Fusarium aquaeductuum (RAU, 1962)
- Pyronema confluens (CARLILE et FRIEND, 1956)
- Coleosporium diospyros (CODNER et POLATT, 1959)

3° Influence inhibitrice

Enfin, dans un très petit nombre de cas, la lumière a une influence inhibitrice sur la pigmentation : retenons les exemples d'un mutant de Blastocladiella emersoni, cité par CANTINO et HORENSTEIN (1959) et d'un mutant de Fusarium aquaeductuum (THEIMER et RAU, 1969).

B/ Les exigences quantitatives en lumière

Il apparaît difficile de définir un seuil d'induction caractérisant cette exigence : ce n'est pas, en effet, un organisme unique qui reçoit le stimulus lumineux, mais une colonie.

(⌘) Espèce non décrite, collection A.M. GOUNOT, souche M₃

Ainsi, le seuil d'induction peut être donné comme la valeur de l'éclairement en dessous de laquelle aucune pigmentation n'apparaît, ou bien comme celle provoquant une synthèse de pigment moitié de la valeur optimale. De toutes façons, il s'agit d'une valeur arbitraire : prenons l'exemple de l'éclairement, défini comme un flux lumineux rapporté à une surface : son efficacité dépend de la densité de population du micro-organisme dans le milieu où il reçoit l'éclairement et de ses dimensions. A l'heure actuelle, les auteurs citent, comme chiffres indicatifs de cette exigence, la valeur de la lamination (x) capable de provoquer la demi-saturation de la réponse caroténogénétique à la longueur d'onde la plus efficace du spectre d'action (cf. le paragraphe suivant, exigences qualitatives en lumière).

Difficile à résoudre d'un point de vue physiologique, ce problème ne le sera sur le plan photochimique, que par la connaissance exacte du photorécepteur et de la photoréaction. Cependant, RILLING (1964) a émis une hypothèse extrêmement intéressante : si chaque bactérie est pleinement induite par 1 quantum et si une suspension bactérienne est exposée à une quantité de lumière insuffisante pour induire pleinement la pigmentation, une fraction des bactéries sera induite et l'autre non, mais il n'y aura pas de différences qualitatives dans la production pigmentaire, par rapport à celle induite par un éclairement saturant. Au contraire, si chaque bactérie exige plus d'un quantum, on devrait trouver, selon cet auteur, par rapport à la suspension bactérienne témoin, des différences d'ordre quantitatif et qualitatif : expérimentalement, cette deuxième proposition est vérifiée chez Mycobacterium sp..

Les auteurs expriment souvent la sensibilité des micro-organismes à la lumière par des courbes dans lesquelles la pigmentation est mesurée en fonction de la durée d'exposition à la lumière, les autres conditions étant optimales. Les courbes reproduites dans la planche 5, (courbes 3 et 4) expriment les résultats obtenus à partir de deux espèces de Mycobacterium chez lesquelles les conditions (xx) d'éclairement conduisant à une pigmentation saturante, sont les suivantes :

- pour Mycobacterium sp., (RILLING, 1962) : 700 foot-candles (= 7500 lux, équivalents à 37,5 W/m²) pendant 90 sec. à 0°C sous oxygène.
- pour M. marinum, (BATRA et RILLING, 1964) : 700 foot-candles (= 7500 lux, équivalents à 37,5 W/m²) pendant 15 min. à 0°C sous air.

Ces deux éclairagements sont donnés à 3 ml de suspension bactérienne à 10 % en poids. HOWES et BATRA (1970) citent également pour Mycobacterium sp. une photo-induction saturante en 50 sec. (au lieu de 90 sec.), avec le même éclairement, mais à partir d'une suspension à 3,3 % en poids. EBERHARD, RAU et ZEHENDER (1961) montrent que la saturation de la pigmentation s'obtient avec 12 000 lux (60 W/m² environ) pendant quatre heures à + 10° C chez Fusarium aqueductuum. Enfin, BURCHARD et HENDRICKS, (1969), trouvent qu'en milieu solide à + 30° C, 5 foot-candles (environ 55 lux, équivalents à 0,25 W/m²) pendant 5 h. provoquent une pigmentation saturante des colonies de Myxococcus xanthus, induites au début de la phase stationnaire. Pour notre part, nous avons montré qu'un éclairement de 5 W/m² pendant 10 h. entraîne une saturation de la réponse caroténogénétique d'Arthrobacter sp. (voir la troisième partie) dans des conditions voisines de celles citées par BURCHARD et HENDRICKS : il doit être possible, d'ailleurs, d'obtenir cette même saturation avec des valeurs d'éclairement encore plus faibles.

(x) La lamination est le produit de l'éclairement par la durée de l'éclairement et s'exprime en J/m² dans le système M.K.S.

(xx) Pour les correspondances entre les diverses unités d'éclairement, se reporter à la deuxième partie, chapitre II, B/, 1°.

Nous sommes loin, à l'énoncé de ces chiffres, des éclairements énergétiques nécessaires pour la photosynthèse (✱) : remarquons au passage que la lumière apparaît comme facteur "déclenchant," particulièrement chez Mycobacterium sp.

A l'exception de ZALOKAR, tous les auteurs ont prouvé que la photo-induction obéit à la loi de BUNSEN-ROSCOE, dite loi de réciprocité, qui s'énonce ainsi : "l'effet photochimique est le même lorsque la lumen est constante". Puisque chez les micro-organismes étudiés, cette loi se vérifie sur des intervalles assez grands de temps et d'éclairement, nous avons là une preuve supplémentaire que la photoinduction est une réaction photochimique. MATHEWS (1963) précise que pour des temps très courts et des éclairements très grands, la quantité de pigments produits est un peu plus faible que celle prévue par la loi de réciprocité, mais REID (1957) mentionne que ce phénomène se retrouve généralement dans les réactions photochimiques.

MATHEWS, dans la même publication, met en évidence un "effet de mémoire" chez Mycobacterium marinum. Une exposition de 5 min. à 200 foot-candles (= 2200 lux, équivalant à $2,2 \text{ W/m}^2$) à l'aide d'une source à incandescence est insuffisante pour initier la pigmentation ; par contre, une exposition de 20 min. provoque une pigmentation normale. Quatre séries de colonies bactériennes sont illuminées pendant 20 min. en quatre fractions de 5 min. séparées par des intervalles d'obscurité de durée variable (10 min., 30 min., 2 h. et 12 h.) : après incubation, les colonies des quatre séries ont pigmenté.

Un effet très curieux a été mis en évidence par RILLING (1964) : l'exposition de suspensions bactériennes (Mycobacterium sp.) à de très hautes intensités lumineuses sous atmosphère d'azote, avant l'illumination sous oxygène, réduit la photo-inductibilité des bactéries ; cette même exposition, faite après l'illumination, demeure sans influence : elle n'intervient donc pas sur la fabrication des pigments ni sur le métabolisme (on sait que les fortes intensités lumineuses peuvent provoquer la photolyse des cellules) mais bien sur le mécanisme photochimique lui-même.

C/ Les exigences qualitatives en lumière : spectres d'action

Il n'existe à notre connaissance que trois Bactéries et deux Champignons pour lesquels un spectre d'action de la lumière sur la caroténogénèse soit connu. Cependant, si un certain nombre d'interprétations ont été avancées, l'identification des photorécepteurs reste encore incertaine.

1° Le principe de la mesure des spectres d'action

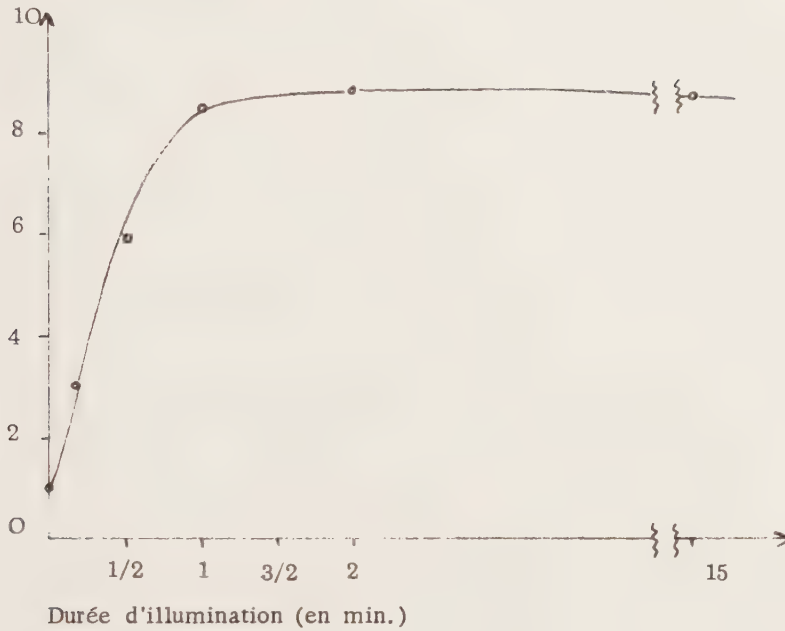
L'effet photobiologique, ici la production de caroténoïdes, est mesurée en fonction de la longueur d'onde de la lumière que reçoit l'échantillon. D'un point de vue pratique, le spectre U.V. -visible est divisé en tranches spectrales d'une dizaine de nm. : dans chacune d'entre elles, l'échantillon reçoit la même quantité d'énergie. L'effet photobiologique est porté en ordonnées d'un graphique dont l'axe des abscisses porte les diverses longueurs d'onde utilisées. La courbe obtenue est

(✱) A propos de la photosynthèse, HELLER (1969) cite les chiffres de 100 à 200 W/m^2 comme éclairement moyen des feuilles d'un arbre en plein soleil ; $1\,000 \text{ W/m}^2$ représentent la valeur maximale de l'éclairement produit par le soleil au zénith en été. Le point de compensation (valeur de l'éclairement pour laquelle les volumes de l'oxygène dégagé par la photosynthèse et de celui absorbé par la respiration sont égaux) varie de 10 W/m^2 (plantes de soleil) à 2 W/m^2 (plantes d'ombre).

COURBE 3

d'après RILLING, (1962)

μg de caroténoïdes / flacon

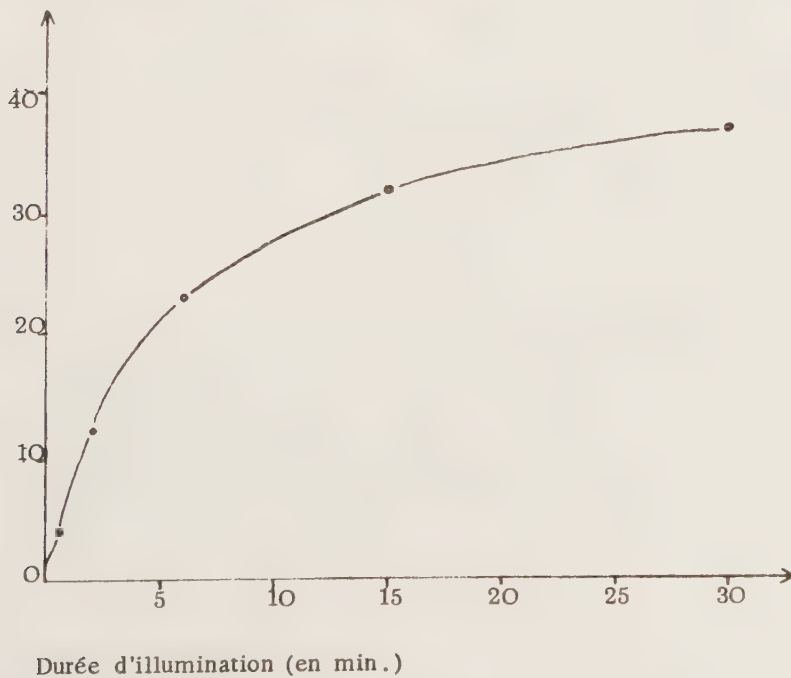


Influence de la durée d'illumination sur la quantité de caroténoïdes synthétisés par Mycobacterium sp. (Eclairement de 700 foot-candles).

COURBE 4

d'après BATRA et RILLING, (1964)

μg de caroténoïdes / 100 mg de poids sec



Influence de la durée d'illumination sur la caroténogénèse de M. marinum (éclairement de 700 foot-candles à 0° sous oxygène).

le spectre d'action de la lumière sur le phénomène considéré.

BATRA et RILLING (1964) donnent un exemple de cette technique ; dans un premier temps, les auteurs s'assurent que la loi de réciprocité est vérifiée pour chacune des tranches spectrales : ils veulent en effet égaliser les luminations en ne modifiant que les durées d'éclairement. Ils tracent pour cela une courbe de pigmentation relative en fonction de la lumen pour chaque longueur d'onde ; ils n'utilisent d'ailleurs pas la lumen telle qu'elle est définie, mais le rapport de l'énergie quantique, exprimée en Einstein (énergie du quantum à la fréquence considérée multipliée par le nombre d'Avogadro, $N = 6,02 \cdot 10^{23}$) à la surface de réception. La pente des droites obtenues dans chaque tranche spectrale mesure l'effet photobiologique.

Par cette technique, les auteurs obtiennent les valeurs de l'énergie quantique caractérisant les exigences quantitatives des micro-organismes, exigences dont nous avons parlé au paragraphe précédent. Citons les chiffres suivants : d'après HOWES et BATRA (1970), $5,3 \cdot 10^4$ erg/cm² (soit 53 J/m²) provoquent la demi-saturation de la caroténogénèse chez Mycobacterium sp. à 445 nm, longueur d'onde la plus efficace pour cette espèce. Pour Neurospora crassa (ZALOKAR, 1955) cette même réponse est obtenue à 465 nm avec 10^5 erg/cm² et pour Myxococcus xanthus (BURCHARD et HENDRICKS, 1969) avec $2 \cdot 10^5$ erg/cm² à 410 nm.

Pour identifier le photorécepteur, il faudra trouver un corps dont le spectre d'absorption soit superposable au spectre d'action obtenu expérimentalement ; si par ailleurs ce corps, de structure connue, a été caractérisé dans le micro-organisme et si son spectre d'absorption ne peut être confondu avec celui d'autres composés pouvant présenter les mêmes propriétés de photoréactivité, l'identification sera considérée comme certaine.

Nous voulons citer à ce propos, une très belle expérience de WOLKEN et JEROME (1969) démontant le mécanisme de photoréception qui déclenche le phototropisme chez Phycomyces blakesleeanae. Ils obtiennent deux spectres par microspectrophotométrie dans la zone de croissance du sporangiophore de la souche sauvage. En allant de la base au sommet, ce sont respectivement des spectres de carotène et de flavine. Les deux spectres d'absorption combinés reproduisent le spectre d'action de la photoréponse. La même expérience, conduite sur une variété albino, ne permet de mettre en évidence qu'une flavine réduite.

2° Exemple d'interprétation

Parmi les cinq cas considérés, il n'est fait mention que de deux types de spectres d'action, si l'on excepte celui obtenu par MATHEWS avec une souche de Mycobacterium marinum :
- dans le premier, que nous appellerons type "flavine", un maximum à 380-385 nm et une zone d'absorption d'intensité supérieure, étalée entre 410 et 480 nm, comportant trois pics, donnent à penser que le photorécepteur est une flavine ou un caroténoïde.

- dans le deuxième type, que nous appellerons type "porphyrine", se trouvent les pics caractéristiques des noyaux tétrapyrroliques de type porphyrine : un maximum très aigu aux environs de 400 nm (bande de SORET) et deux à trois pics secondaires compris entre 500 et 600 nm.

- quant au spectre d'action obtenu par MATHEWS, il semblerait qu'il soit la résultante des deux premiers puisqu'on y trouve la zone d'absorption caractéristique des flavines (avec un maximum étalé vers 440 nm) et les pics des porphyrines (un maximum à 410 nm, plus important que trois maximums situés à 502, 528 et 560 nm).

Voici les cinq micro-organismes pour lesquels les spectres d'action de la photo-induction caroténogène sont actuellement connus

- Neurospora crassa : ZALOKAR (1955)
- Fusarium aqueductum : RAU (1967)
- Mycobacterium sp. : RILLING (1964)
- Mycobacterium marinum : BATRA et RILLING (1964)
- Myxococcus xanthus : BURCHARD et HENDRICKS (1969)

De type "flavine" chez les trois premiers micro-organismes, le spectre d'action appartient au type "porphyrine" pour les deux autres.

Examinons les interprétations données par BATRA et RILLING (1964) à partir des résultats obtenus avec les deux espèces de Mycobacterium.

a/ Chez Mycobacterium sp. (planche 6, courbe 5), les maximums du spectre d'action montrent une concordance presque parfaite avec ceux du spectre d'absorption de certaines flavo-protéines ; en outre, diverses expériences viennent étayer l'hypothèse selon laquelle le photorécepteur serait un complexe flavoprotéique. Si, comme nous l'avons vu, les pH acides inhibent la photo-induction leur action n'est pas instantanée alors qu'au contraire, la photosensibilité redevient normale dès que la bactérie est replacée à son pH optimum. Ce comportement est à rapprocher de celui des complexes flavo-protéiques, dont la dissociation en milieu acide s'effectue beaucoup plus lentement que l'association, quasi instantanée, en milieu neutre.

L'hydrosulfite est inhibiteur de la photo-induction; or il réduit les flavines, et ces dernières, n'absorbant plus dans le visible et le proche ultra-violet, deviennent inertes comme photorécepteurs. Notons que ce composé est inactif chez Mycobacterium marinum, dont le spectre d'action est de type "porphyrine".

Enfin, HOWES et BATRA (1970) ont extrait de Mycobacterium sp. une flavine, dont ils n'ont pas élucidé la structure, mais dont le spectre d'absorption correspond, en première approximation, au spectre d'action. Ils n'écartent cependant pas complètement l'hypothèse selon laquelle le photorécepteur serait un complexe entre une protéine et un carotène trouvé dans les cellules non illuminées.

De tels résultats sont à rapprocher de ceux de RAU (1967 a) : cet auteur a montré que le spectre d'action de Fusarium aquaeductuum est très proche, d'une part des spectres d'absorption de deux flavo-protéines (L- α -hydroxy-acide-oxydase et lipoyl-déshydrogénase), d'autre part du spectre d'action de la lumière sur le phototropisme de sporangiophores de Phycomyces blakesleeana.

Il faut ouvrir ici une parenthèse : des spectres d'action de type "flavine" ont été trouvés pour des photoréponses très différentes : outre le phototropisme de Phycomyces blakesleeana (CURRY et GRUEN, 1959 ; DELBRUCK et SHROPSHIRE, 1960), citons l'étiollement du stipe de Coprinus lagopus (SCHEINERDERHOLM, 1954), la stimulation de la croissance de Blastocladiella emersoni (CANTINO et HORENSTEIN, 1959), la réponse photomorphogénétique de Pilobolus kleinii, (PAGE, 1952), la stimulation de la décharge sporale de Sordaria fimicola (INGOLD, 1958) et de la germination des spores de Physoderma maydis (HEBERT et KELMAN, 1958).

Cette diversité des réponses photomorphogénétiques à partir d'un même type de photorécepteur renforce encore l'idée de l'existence de deux phases indépendantes, l'une photochimique, l'autre morphogénétique ; la première phase se situe au niveau électronique de la molécule et elle est indifférente à la réponse spécifique qu'elle déclenche au niveau génétique de l'individu.

Une constatation s'impose enfin : les radiations rouges, de longueur d'onde supérieure à 600 nm, dont l'importance n'est plus à démontrer chez les Phanérogames, ne serait-ce que dans le photopériodisme, ne semblent pas avoir d'influences physiologiques chez les Bactéries et les Champignons.

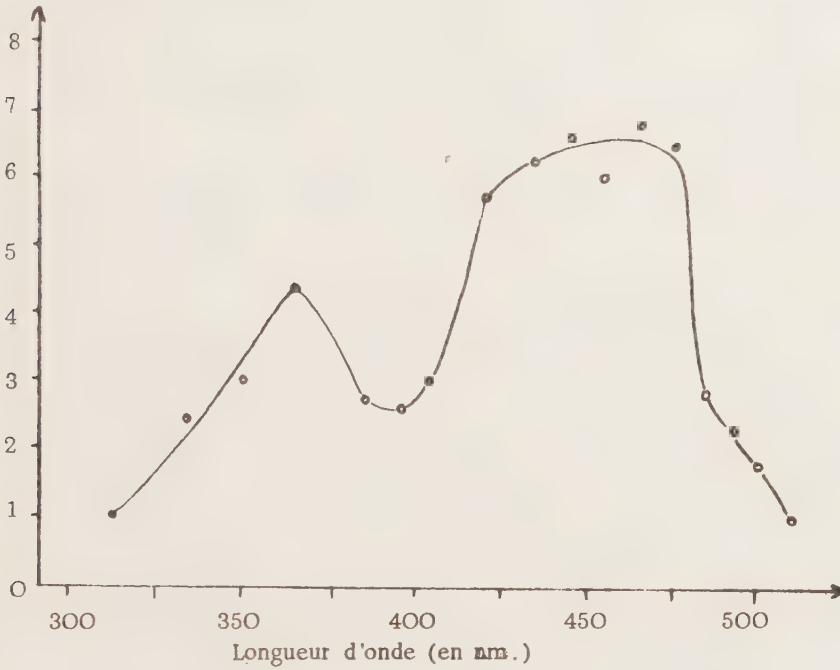
b/ Le deuxième exemple choisi montre également la difficulté d'une identification précise du photorécepteur : chez Mycobacterium marinum, (planche 6, courbe 6) le spectre d'action ressemble au spectre d'absorption d'une porphyrine. Or, HOWES et BATRA (1970) ont pu extraire de la bactérie un tel composé, soit mésoporphyrine, soit coproporphyrine. Comme dans le premier exemple, l'hypothèse est renforcée par la caractérisation d'une porphyrine (protoporphyrine IX) chez Myxococcus xanthus (BURCHARD et HENDRICKS, 1969) : là encore, spectre d'action et spectre d'absorption sont comparables.

Pourtant, chez M. marinum, les maximums observés ne se correspondent pas dans

COURBE 5

d'après BATRA et RILLING, (1964)

Réponse caroténogénique relative

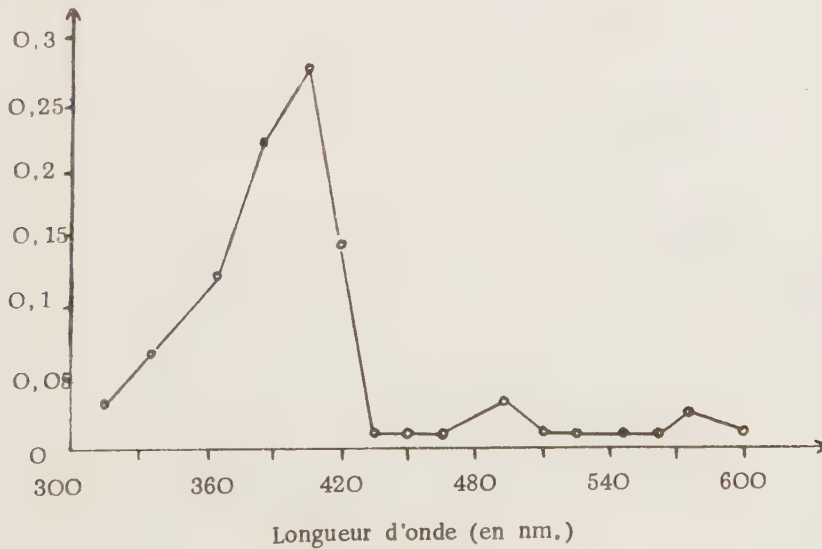


Spectre d'action de la lumière sur la caroténogénèse de *Mycobacterium* sp. : l'ordonnée représente la valeur négative de la pente de la courbe obtenue dans chaque tranche spectrale en portant la pigmentation relative en fonction de la lumination.

COURBE 6

d'après BATRA et RILLING, (1964)

Réponse caroténogénétique relative



Spectre d'action de la lumière sur la caroténogénèse de *M. marinum*. Les coordonnées sont définies comme pour la courbe précédente.

leur structure fine : les pics d'absorption se situent à 398, 495, 528 et 568 nm (solvant éther-acide acétique) ou à 404, 548 et 592 nm (solvant acide chlorhydrique à 25 %) et les maximums du spectre d'action sont à 404, 493 et 577 nm. HOWES et BATRA pensent que in vivo, les maximums des spectres d'action et d'absorption peuvent cependant coïncider, puisque in vitro les positions des maximums d'absorption varient avec les solvants utilisés. Il est également possible que la porphyrine responsable soit liée in vivo à un composé qui, sans avoir lui-même de spectre d'absorption, modifierait celui de la porphyrine.

D/ Les inducteurs chimiques, substituts du facteur lumière

Le dernier paragraphe de ce chapitre est consacré aux inducteurs chimiques, corps capables de se substituer à la lumière pour induire la caroténogénèse. Les expériences auxquelles ils ont donné lieu ont d'ailleurs permis d'aller plus loin dans la connaissance du mécanisme de la pigmentogénèse.

RAU (1967 b) montre que le para-hydroxy-mercuri-benzoate (PHMB) et le para-chloro-mercuri-benzoate (PCMB) peuvent induire la pigmentation, à l'obscurité, chez Fusarium aquaeductuum. Une période de latence plus grande, que l'auteur explique par la toxicité élevée de ces inhibiteurs des groupements -SH des protéines, est suivie par une pigmentation normale, plus élevée dans le cas du PCMB : un temps d'incubation de deux heures en présence des poisons est suffisant pour une induction totale. D'autres inhibiteurs des groupements -SH, de même que l'acide benzoïque et divers dérivés mercuriques, se révèlent incapables d'une telle action. RAU émet d'abord l'hypothèse que la lumière et les benzoates de mercure agissent de la même manière, la lumière bloquant par photo-oxydation les groupements -SH d'un composé spécifique. Mais, par la suite, THEIMER et RAU (1969) montrent que les sites d'action des deux facteurs sont génétiquement différents grâce à un mutant rouge sombre (RD-1) de Fusarium aquaeductuum. Chez RD-1, la pigmentation se produit normalement à l'obscurité sans induction préalable : or la lumière provoque une inhibition de 5 à 10 % dans la formation des caroténoïdes et le mercuri-benzoate un accroissement de cette synthèse. Deux hypothèses se présentent : ou bien les sites d'action de la lumière et du mercuri-benzoate sont différents, ou bien il y a eu deux mutations simultanées. La première hypothèse apparaît beaucoup plus probable que la seconde.

Ajoutons que l'actidione (cycloheximide) inhibiteur de la synthèse protéique, a le même effet sur la pigmentation de Fusarium aquaeductuum (RAU 1967 b) que le chloramphénicol sur celle de Mycobacterium sp. : son utilisation permet à l'auteur de conclure que l'induction chimique, comme la photo-induction, font intervenir une régulation au niveau de l'A.D.N., et que, dans les deux cas, l'induction est suivie de la synthèse de novo des enzymes de la caroténogénèse.

Tout récemment (THEIMER et RAU, 1970), un autre corps a été reconnu capable de jouer le même rôle inducteur que les mercuribenzoates et la lumière chez Fusarium aquaeductuum : l'eau oxygénée. Les auteurs pensent que le même site régulateur sur l'A.D.N. est mis en cause par la lumière et l'eau oxygénée ; en effet, les cinétiques de fabrication des pigments sont les mêmes et l'actidione se révèle un inhibiteur efficace de la pigmentation dans les deux cas.

Quant à BATRA (1967 a et b), c'est un curieux hasard qui l'a mis en présence d'un inducteur chimique chez M. marinum. Afin de voir si le cytochrome de la chaîne respiratoire peut être le photorécepteur, il utilise l'antimycine A, connue pour bloquer le flux des électrons dans la chaîne respiratoire au niveau du cytochrome : mais, à sa grande surprise, au lieu de l'inhibition attendue, il constate "a dramatic increase in carotenoid synthesis" ; cette stimulation peut atteindre 400 % du témoin induit par la lumière. De plus, les effets de l'antimycine A et de la lumière sont additifs : BATRA en conclut que leurs sites d'action au niveau de l'A.D.N. sont différents.

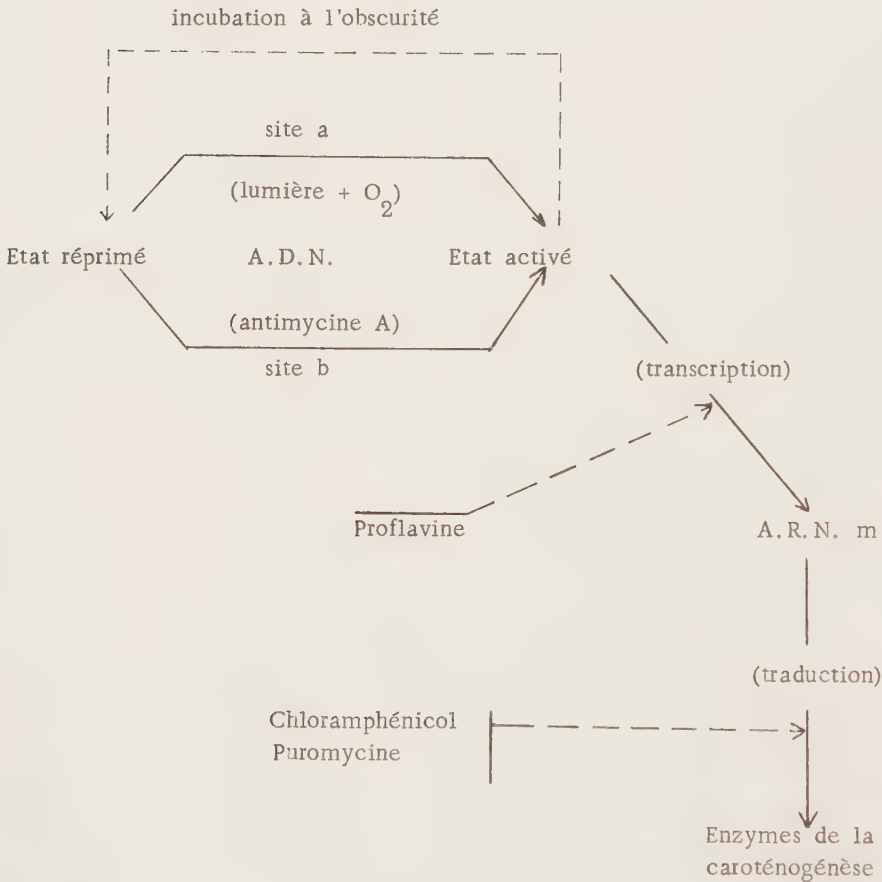
Deux expériences complémentaires vont lui permettre de proposer un mécanisme de régulation de la synthèse caroténoïdique :

- chez Mycobacterium marinum, la caroténogénèse est totalement bloquée par les inhibiteurs de la synthèse protéique et l'effet inhibiteur diminue lorsqu'augmente le temps écoulé entre l'induction

lumineuse et le moment où l'inhibiteur est ajouté au milieu de culture. Pour un temps égal à 4 heures, l'effet inhibiteur s'annule. Mais si l'induction a été réalisée par l'antimycine A, l'inhibition persiste après 20 heures d'incubation à l'obscurité (planche 7, courbe 7).

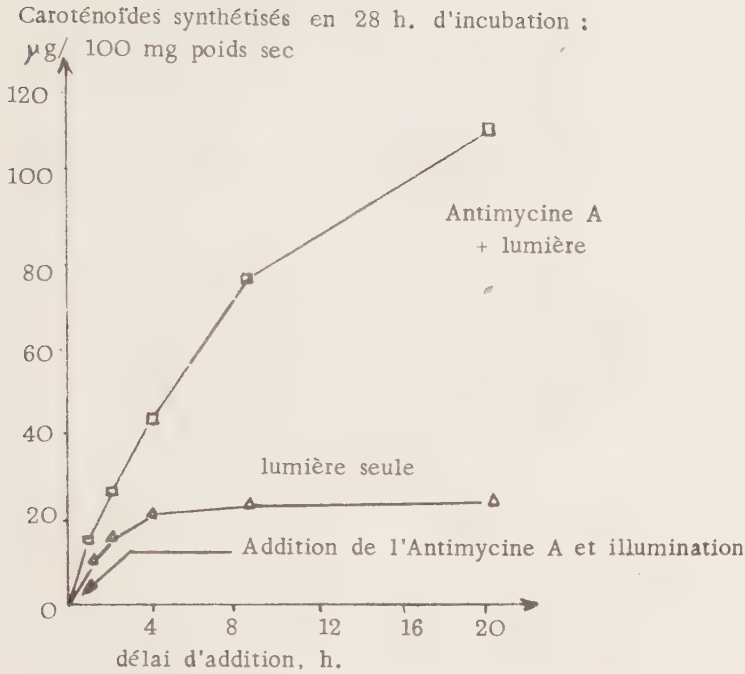
- Trois lots de flacons contenant des suspensions de bactéries de cette même espèce, sont illuminés de façon à provoquer une pigmentation maximale : immédiatement après l'induction, un inhibiteur de la synthèse protéique (chloramphénicol ou proflavine) est ajouté au cours de l'incubation, à des intervalles de temps variés, aux flacons du premier lot : dans cette série, l'action de l'inhibiteur s'annule pour un temps d'addition de quatre heures et une deuxième induction lumineuse est alors donnée aux flacons du deuxième et du troisième lot. Les flacons du deuxième lot reçoivent l'inhibiteur après différentes durées d'incubation et le même schéma est appliqué aux flacons du troisième lot : à la suite des deuxième et troisième illuminations, les suspensions bactériennes se révèlent sensibles à l'action de l'inhibiteur (planche 7, courbe 8).

Le mécanisme proposé par BATRA et STORMS (1968) est le suivant :



COURBE 7

d'après BATRA, (1967 b)

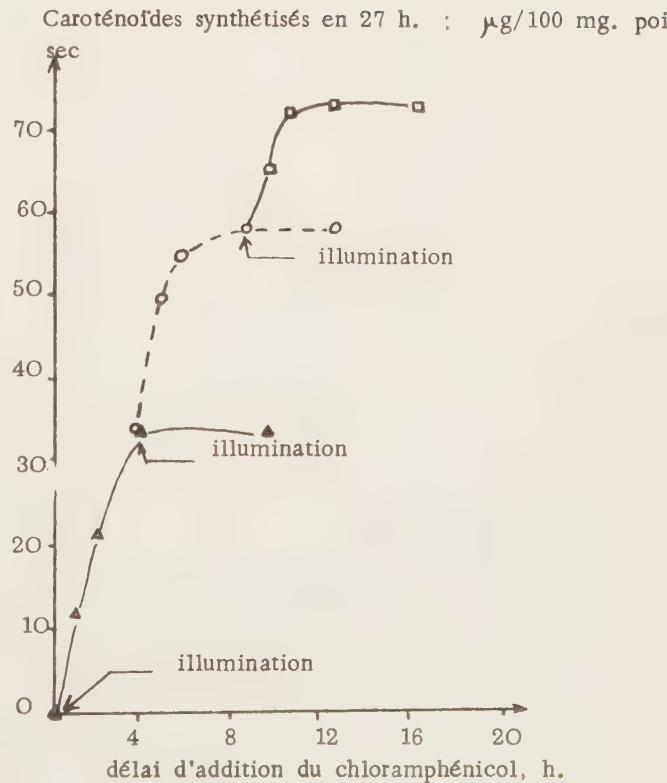


Effet du moment de l'addition du chloramphénicol au cours de l'incubation à l'obscurité de bactéries induites (*M. marinum*)

COURBE 8

d'après BATRA, (1967 b)

Effet d'illuminations répétées sur la caroténogénèse de *Mycobacterium marinum* : des aliquotes (3 ml) de suspension bactérienne sont placées dans des erlens de 25 ml et illuminées pendant 20 minutes avec un éclairage de 700 foot-candles à 0° C dans l'air. Après addition de 0,2 ml d'une solution de glycérol (2 M/l), l'incubation est conduite à l'obscurité à + 30° C. Le chloramphénicol est ajouté au cours des quatre premières heures de l'incubation, à des moments variés pour chaque flacon. Tous les erlens sont ensuite portés à 0° C et illuminés une deuxième fois, à l'exception de ceux qui ont reçu du chloramphénicol : une nouvelle incubation de quatre heures commence et du chloramphénicol est ajouté à la deuxième série de flacons selon le même mode que précédemment. Le même schéma est repris une troisième fois : l'incubation est arrêtée après une durée totale de 27 h., non compris les périodes d'illumination et de descente en température.



L'auteur pense qu'au bout de quatre heures, le processus de transcription de l'A.R.N. messenger s'arrête : soit le composé formé lors de la photoréaction était activateur et il a été dégradé, soit ce composé était répresseur et il a été oxydé par la lumière, puis s'est accumulé durant les quatre heures d'incubation à l'obscurité. Après ce laps de temps, une nouvelle illumination rendra les bactéries sensibles à l'action des inhibiteurs de la synthèse protéique.

Dans le cas d'une induction chimique, les bactéries sont maintenues dans l'état activé par l'inducteur, qui, à l'inverse du stimulus lumineux, reste présent dans le milieu. Elles sont alors constamment sensibles aux inhibiteurs de la synthèse protéique.

A l'issue de cette mise au point bibliographique, nous constatons d'une part que, malgré l'importance des travaux réalisés, le champ d'investigation reste immense, eu égard au nombre de micro-organismes caroténogènes et photosensibles existant, et que d'autre part, des trois phases du mécanisme de la caroténogénèse, seule la seconde a été l'objet d'une étude exhaustive, en proportion de l'essor qu'a pris la Biologie Moléculaire cette dernière décennie : l'étude de la première phase sous un angle purement photochimique, de même que celle, enzymologique, de la troisième phase, restent à faire.

DEUXIEME PARTIE

TECHNOLOGIE

Pour étudier le photocontrôle de la caroténogénèse des micro-organismes, il nous fallait disposer, tout comme les auteurs dont nous avons cité les travaux, d'un appareillage nous permettant de dissocier les facteurs de milieu qui conditionnent la pigmentation ; nous nous sommes limité aux trois facteurs fondamentaux : température, lumière et atmosphère gazeuse. De tels appareils existent dans le commerce et sont généralement conçus pour contrôler la température, l'énergie lumineuse et le degré hygrométrique mais à notre connaissance, il n'en existe pas qui permettent un contrôle qualitatif de lumière.

Les auteurs qui nous ont précédé, ont adapté à leur propre usage des monochromateurs du commerce, ou bien ont utilisé des systèmes dispersifs tels que prismes et réseaux. Le matériel que nous devons étudier, de même que les réactions mises en jeu, n'exigeant pas, pensons-nous, de très grandes énergies, il n'est pas nécessaire de disposer d'appareillages aussi complexes.

Nous avons donc choisi d'adapter notre matériel à notre étude, c'est-à-dire de construire un appareil qui réponde à nos exigences expérimentales. Un certain nombre d'idées ont guidé ce projet ; il est inutile d'en retracer le cheminement précis et nous en donnerons seulement les résultats. En effet, et c'est probablement chose courante, le prototype a été modifié avant, comme au cours de sa construction, du fait des disponibilités matérielles, des difficultés de réalisation technique et des expériences projetées ; inversement ces expériences ont été déterminées par l'évolution du prototype.

C'est ainsi que, l'idée de départ étant de définir le spectre d'action de la pigmentation d'une bactérie psychrophile, Arthrobacter glacialis, nous avons pensé d'abord à modifier un réfrigérateur de type courant ; nous avons abouti en fait à un appareillage en trois éléments : "élément source lumineuse", "élément source thermique" et "élément d'irradiation", qui est une chambre claire, cylindrique, mesurant environ 18 cm. de hauteur pour 18 cm. de diamètre et pesant trois kilos. Nous sommes fort loin du bloc unique que constituait dans notre idée le réfrigérateur adapté.

Cette formule en trois blocs s'est imposée tout naturellement par sa facilité de réalisation comme par sa souplesse d'utilisation : elle conduit d'ailleurs à la conception d'une cellule de petite taille, car nous voulons travailler sur de petits échantillons végétaux ou bactériens ; il n'est pas question de reconstruire le Phytotron de Gif-sur-Yvette !

La conception de l'appareillage s'est faite en fonction d'un certain nombre d'impératifs :

- régulation de température sur une gamme large : - 10°C à + 50°C.
- contrôle qualitatif et quantitatif de la lumière.
- travail en conditions stériles.
- possibilité d'atmosphère artificielle.

Toutes ces exigences interagissent pour déterminer la forme des éléments que nous allons étudier successivement.

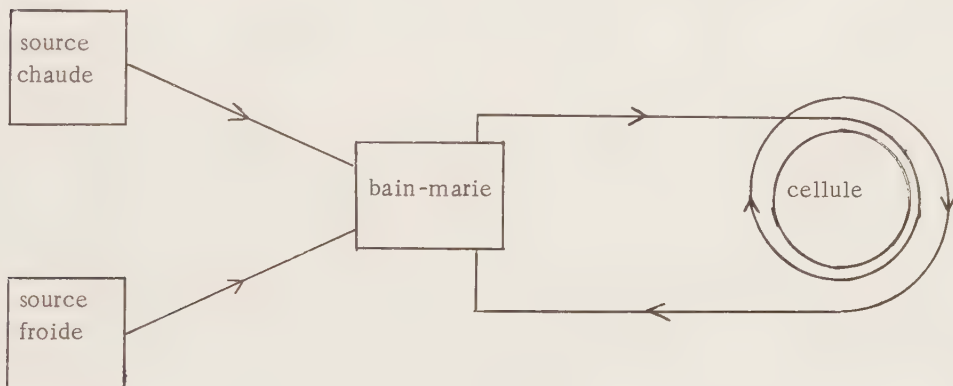
En ce qui concerne la partie commerciale, nous avons rassemblé tous les détails

(prix des divers appareils, nom des fournisseurs, devis d'ensemble, etc...) dans une rubrique spéciale à la fin de cette deuxième partie.

CHAPITRE I

Elément "source thermique"

Le problème, en théorie, n'est pas compliqué : il suffit de disposer d'une source de chaleur et d'une source de froid, et de pouvoir régler à tout moment leurs influences respectives sur la cellule d'expérimentation ; nous avons pensé que le plus simple était de les faire agir indirectement, par l'intermédiaire d'un bain-marie, selon le schéma ci-dessous :



C'est le fluide du bain-marie, dont la température est fixée, qui, circulant dans la cellule, en assure la régulation thermique.

Cette formule s'est révélée extrêmement souple, tant du point de vue du fonctionnement que de celui de l'entretien.

Ce simple schéma donne déjà à la cellule certaines caractéristiques : il faut qu'elle puisse recevoir une circulation de fluide et l'utiliser dans des conditions optimales.

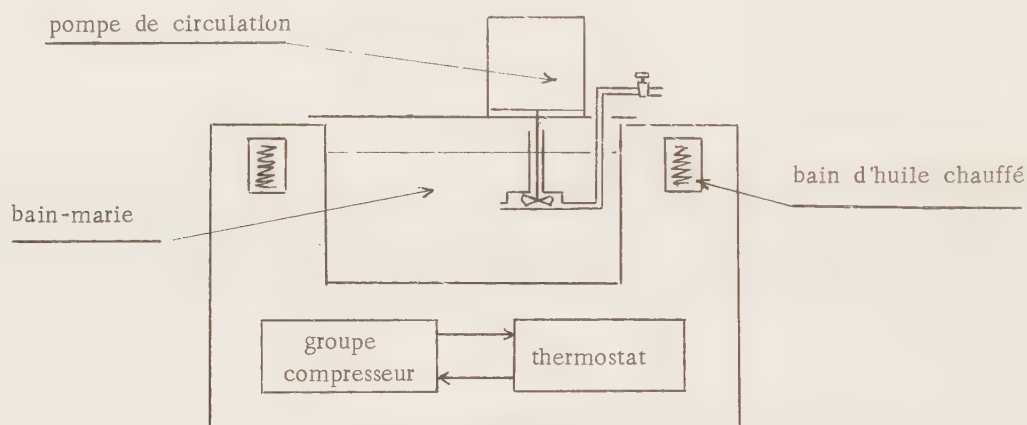
A/ Source froide

Tous les appareils frigorifiques fonctionnent selon la réciproque du théorème de Carnot : "lorsqu'on fournit de l'énergie à un fluide entre une source chaude et une source froide, on peut récupérer de la chaleur si le travail a servi à le refroidir, ou du froid s'il a servi à le

réchauffer, et ceci, avec un rendement obligatoirement inférieur à l'unité. "

Dans la pratique, un moteur, en comprimant un gaz (ou un mélange gazeux, généralement le fréon), lui fournit de l'énergie et le liquéfie : le gaz se détend ensuite, en absorbant des calories, dans le serpentin de réfrigération.

Deux types d'appareils se rencontrent dans le commerce selon que le serpentin de réfrigération est mobile ou non ; le premier type, appelé cryo-plongeur, malgré son évidente souplesse d'utilisation, présente un gros inconvénient : la vapeur d'eau ambiante forme assez rapidement une couche de glace sur le serpentin, ce qui réduit l'efficacité et la puissance de la source. Nous avons acquis un appareil fonctionnant selon la deuxième solution, plus onéreuse mais plus "fiable" : il s'agit d'un bain-marie réfrigéré à circulation.;



Cet appareil, comme le montre le schéma ci-dessus, nous fournit la quasi-totalité de notre élément "source thermique": nous disposons d'une source de froid, d'un bain-marie et d'une pompe qui peut alimenter un circuit extérieur. L'inconvénient du cryo-plongeur est ici évité de la manière suivante : un bain d'huile, chauffé à environ 80°C, forme une barrière d'air chaud autour du bain-marie et empêche la condensation de la vapeur d'eau atmosphérique.

L'appareil, alimenté en 220 Volts et d'une puissance de 270 Watts, est prévu pour maintenir la température de 9 l. de fluide à 1°C près, sur une plage de température s'étendant de -30°C à +15°C.

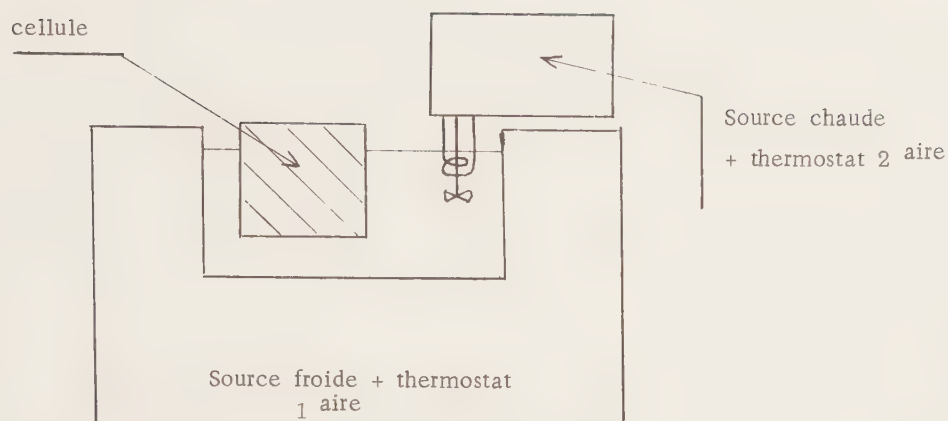
B/ Source chaude

En ce qui concerne la source chaude, nous disposons d'un appareil de type "Rotax", équipé d'une résistance chauffante, d'un agitateur à hélice et régulé par thermomètre à contact : ce petit appareil, tout en servant de source chaude, permet une régulation que nous dirons secondaire par rapport à celle réalisée dans la source de froid.

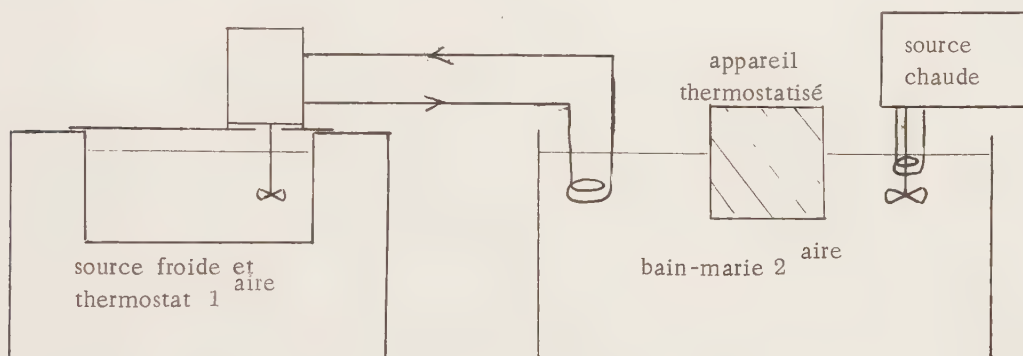
C/ Schémas de fonctionnement

Nous avons utilisé divers schémas de fonctionnement, représentés ci-dessous :

- utilisation directe, la plus sûre ; la cellule ou le matériel à thermostatiser sont immergés dans le bain-marie.



- utilisation "duoplay" : la pompe du bain-marie réfrigéré alimente une circulation dans un deuxième bain-marie où se trouve la source chaude ; c'est le dispositif que nous avons employé pour les précultures de micro-organismes :



- utilisation "multiplay" : plusieurs bains-marie sont branchés sur la circulation générale de froid ; chacun possède sa source chaude et donc sa propre température.

D/ Exemples

Nous donnerons quelques caractéristiques de l'appareil et des exemples d'utilisation :

- la descente en température, avec circulation extérieure, s'effectue dans les conditions suivantes :

temps	0	15'	30'	45'	1 h	1 h 30'
température	+ 22°C	+ 12°C	+ 2°C	- 3°C	- 8°C	- 15°C

- Les cultures d'Arthrobacter sp. en milieu solide ont été maintenues à + 25° C pour toutes les illuminations réalisées (x).
- Arthrobacter glacialis a été cultivée en milieu liquide à + 12° C.
- nous avons tenté de déterminer les spectres d'action de trois micro-organismes : Arthrobacter sp. à + 25° C, A. glacialis à + 12° C et Sporidiolobus johnsonii à + 22° C.

(x) Voir le détail du dispositif expérimental dans notre troisième partie.

CHAPITRE II

Elément "source lumineuse"

Si la réalisation de l'élément "source thermique" n'a pas posé de problèmes techniques majeurs, il n'en a pas été de même pour l'élément "source lumineuse" ; rappelons les besoins de l'expérimentation, qui se définissent très simplement : contrôle qualitatif et quantitatif de la lumière.

Le choix de la source détermine celui du contrôle qualitatif de l'émission. En effet, nous classerons les sources lumineuses en simples et complexes : les simples, à spectre continu, comme la lampe à incandescence ordinaire ou la lampe dite à halogène, n'exigent pas d'installations spéciales, contrairement aux sources complexes, à spectre discontinu. Pour ces dernières, une alimentation en haute tension (lampe au Xénon) ou des accessoires particuliers (lampe à vapeur de mercure à haute pression) se révèlent nécessaires. Enfin, si pour les sources lumineuses à spectre discontinu, le contrôle qualitatif s'obtient indifféremment avec des prismes, des réseaux ou des filtres, il est matériellement plus facile et plus rentable d'utiliser des filtres avec des sources à spectre continu.

De même, les optiques, qui traitent le faisceau pour le rendre utilisable par le système de contrôle qualitatif, ne sont pas identiques : les filtres interférentiels, pour leur part, ne sont efficaces que sur un faisceau parallèle ; au Phytotron de Gif-sur-Yvette, c'est un miroir qui renvoie sur les échantillons la lumière dispersée par des réseaux.

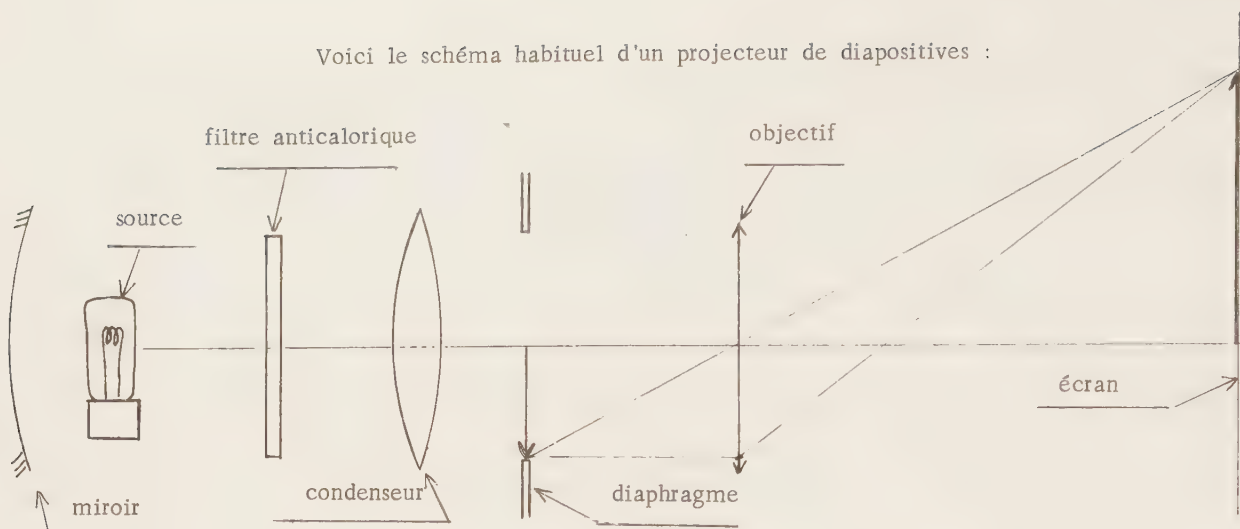
Ces exigences étant définies, et tenant compte du fait que les phénomènes à étudier, d'ordre catalytique, n'exigent pas de très hautes énergies, l'ensemble le plus facile à réaliser est le suivant : filtres colorés et source à incandescence.

Mais, comme pour l'élément "source thermique", nous avons été amené à modifier considérablement l'élément "source lumineuse", au cours même de son élaboration. Nous allons donc décrire l'appareillage que nous avons choisi, puis les diverses modifications apportées.

A/ L'appareil et ses accessoires

Deux appareils commercialisés, dans lesquels le flux omni-directionnel de la source se trouve concentré dans une direction privilégiée, nous fournissent un premier traitement de l'émission : l'agrandisseur photographique et le projecteur de diapositives. Nous avons préféré le second, car il comporte une soufflerie, qui se révèle très utile pour un fonctionnement de longue durée, et un filtre anti-calorique, absorbant les radiations infra-rouges, indispensable pour protéger les filtres interférentiels contre une détérioration par la chaleur.

Voici le schéma habituel d'un projecteur de diapositives :



Grâce à un miroir et à un condensateur parabolique, le flux est rendu approximativement parallèle et traverse la diapositive : la position de l'objectif est réglée de façon à obtenir une image réelle du plan de la diapositive : nous avons adopté cette disposition, correspondant à l'utilisation normale de l'appareil, car elle donne la meilleure homogénéité d'éclairement.

B/ Les mesures des grandeurs lumineuses

1° Les unités d'éclairement

Dans les publications concernant la photobiologie des micro-organismes, deux types différents d'unités d'éclairement sont utilisés : d'une part, le lux et le foot-candle, unités d'éclairement physiologique, d'autre part, le Watt/m² et l'erg/cm²/s, unités d'éclairement énergétique. Entre les deux types d'unités, la correspondance se fait, pour chaque longueur d'onde du spectre de la source considérée, par l'intermédiaire de V , défini comme l'efficacité lumineuse relative photopique (voir le 1° de la planche 8).

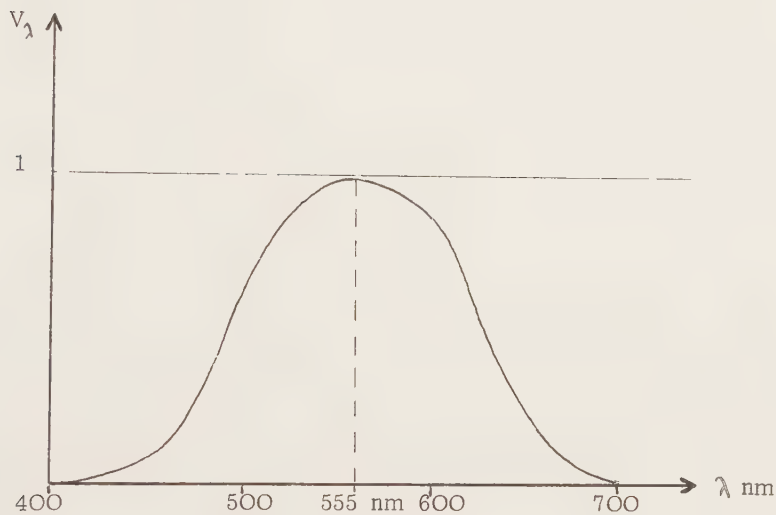
Mathématiquement, il est assez facile de calculer cette correspondance pour des sources n'émettant que quelques raies de longueur d'onde et d'énergie bien définies. Pour une source à spectre continu, où toutes les longueurs d'onde du spectre visible sont représentées avec des énergies différentes, le calcul est beaucoup plus long. Aussi, les biologistes emploient-ils souvent, pour une source donnée, une correspondance empirique entre les deux types d'unités : par exemple, ils admettent que, pour une source incandescente usuelle, portée à sa température normale de fonctionnement, 1 lumen correspond à 10^{-2} W, c'est-à-dire 1 lux à 10^{-2} W/m² (voir le 2° de la planche 8). Pour un tube fluorescent blanc, la correspondance admise est de $5 \cdot 10^{-3}$ W/m² pour 1 lux.

Il nous semble préférable, pour mesurer la sensibilité à la lumière d'échantillons végétaux de toute sorte, d'utiliser une unité qui, d'une part ne dépende pas de la sensibilité de l'oeil humain, et d'autre part fasse partie du système d'unités international M.K.S. . Nous exprimerons donc les éclairements énergétiques en W/m².

2° La thermopile

Les mesures d'éclairement énergétique sont faites au moyen d'une thermopile (marque Kipp et Zonen, type compensé CA 1). Cet instrument, sensible et précis, n'échappe pourtant pas à la difficulté d'un étalonnage absolu : tant qu'il s'agira de comparer des énergies, nous pourrions assurer la validité des résultats ; nous serons beaucoup plus prudent en ce qui concerne les

- 1° L'efficacité lumineuse relative photopique d'une couleur spectrale V_λ définie comme le rapport entre le nombre de lumens produits par un certain flux énergétique de la radiation λ et le nombre de lumens produits par le même flux énergétique de la radiation $\lambda = 555 \text{ nm}$, pour laquelle l'oeil possède le maximum de sensibilité.



- 2° L'éclairement d'un élément de surface est le rapport du flux reçu par cet élément à son aire :

Unités d'éclairement physiologique dans les systèmes :

- MKS : $1 \text{ lux} = 1 \text{ lumen/m}^2$
- CGS : $1 \text{ phot} = 1 \text{ lumen/cm}^2 = 10^4 \text{ lux}$
- Anglo-saxon : $1 \text{ foot-candle} = 10,76 \text{ lux}$.

Unités d'éclairement énergétique dans les systèmes :

- MKS : 1 Watt/m^2 (1 W/m^2)
- CGS : $1 \text{ erg/cm}^2/\text{s}$;
rappelons que $1 \text{ erg/s} = 10^{-7} \text{ W}$
et donc que $1 \text{ erg/cm}^2/\text{s} = 10^{-3} \text{ W/m}^2$.

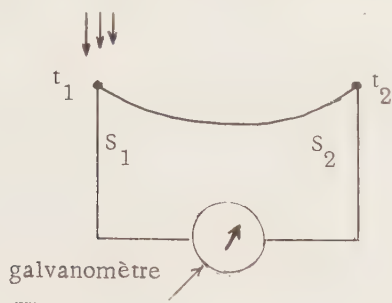
TABLEAU IV

Comparaison des thermopiles

λ en nm	HILGER		KIPP et ZONEN		
	nombre de gradua- tions du galvano- mètre	valeur correspon- dante de l'éclai- rement en W/m ²	nombre de gra- duations du gal- vanomètre	valeur de l'éclai- rement pour une graduation en W/m ²	erreur relative sur l'étalonnage
367	2,3	1,6	1,3	1,2	25 %
407	2,55	1,8	1,25	1,4	23 %
450	4,95	3,5	3,5	1,0	10 %
495	8,0	5,6	5,55	1,0	6,5 %
554	11,35	7,9	8,4	0,9	4 %
sans filtre coloré	43	30,1	36,5	0,9	0,6 %

mesures absolues.

Le principe de fonctionnement est celui de l'effet thermo-électrique : entre deux soudures de métaux différents, portées à des températures t_1 et t_2 , il apparaît une force électromotrice (f. é. m.), mesurée par un galvanomètre.



L'une des soudures, S_1 , source chaude, reçoit un rayonnement qui l'échauffe à la température t_1 et l'autre, S_2 , source froide, demeure à la température t_2 ; S_2 est donc soigneusement calorifugée et S_1 , placée dans le vide pour éviter les échanges de chaleur autrement que par radiation, se trouve protégée par une fenêtre, dont la nature dépend du domaine spectral où l'on veut conduire la mesure.

La qualité de la mesure dépend d'une part de la sensibilité spectrale de la thermopile et d'autre part de la sensibilité du galvanomètre mesurant sa f. é. m. .

a/ La sensibilité spectrale de la thermopile

Du point de vue théorique, n'importe quelle énergie rayonnante, quelle que soit la fréquence qui la caractérise dans le spectre, depuis les rayons γ jusqu'aux ondes hertziennes, peut faire apparaître une f. é. m. si elle est absorbée par S_1 , considérée comme un corps noir ; bien entendu, sur la plan pratique, l'absorption, qui dépend de la forme et de la qualité du matériau, varie avec la longueur d'onde, et la sensibilité spectrale n'est pas une constante.

A titre d'exemple, comparons les sensibilités respectives de notre thermopile et de celle dont dispose M. MOURAVIEFF (thermopile Hilger, type SCHWARTZ linéaire FT 3) ; cet instrument, étalonné au Laboratoire central d'essais du Conservatoire National des Arts et Métiers de Paris, provoque la déviation d'une graduation du galvanomètre que nous utilisons, pour un éclaircissement énergétique incident de $0,7 \text{ W/m}^2$.

Nous avons d'abord comparé les réponses des thermopiles recevant un même flux de lumière blanche, émis par une lampe quartz-iode (24 V, 250 W) et appauvri en rayonnement infra-rouge par passage à travers un filtre anticalorique (tableau IV, planche 9).

De plus, nous avons voulu nous assurer que les sensibilités des deux thermopiles aux différentes longueurs d'onde du spectre visible sont identiques : nous avons donc comparé leurs réponses directement derrière les filtres interférentiels que nous utiliserons par la suite, et dont les caractéristiques sont données dans le tableau VI de la planche 10, avec comme source lumineuse, le dispositif simplifié décrit dans la figure 4 de la planche 15.

Les résultats (tableau IV, planche 9) sont exprimés en nombre de graduations du même galvanomètre, et la valeur de l'éclaircissement correspondant à la déviation d'une graduation du galvanomètre, provoquée par la f. é. m. de la thermopile Kipp et Zonen, se déduit de celle connue pour la thermopile Hilger.

Un certain nombre de remarques se dégagent à la lecture de ce tableau :

- la thermopile Hilger est nettement plus sensible que la thermopile Kipp et Zonen.
- les erreurs réalisées sur les mesures à 367 et 407 nm, sont importantes, parce que l'éclaircissement, très faible, correspond aux plus basses valeurs mesurables.
- pour ces deux longueurs d'onde, les résultats semblent indiquer une divergence des réponses des deux thermopiles, sans certitude toutefois, vu l'importance de l'erreur relative.

Ces remarques nous incitent à la prudence pour établir un étalonnage, d'autant plus que, pour la thermopile Kipp et Zonen, les valeurs trouvées diffèrent nettement de celles indiquées comme référence par le constructeur lui-même. Pour nous, une graduation du galvanomètre correspond à $0,9 \text{ W/m}^2$; d'après le constructeur, la thermopile débite $12,5 \mu\text{V}$ pour un éclaircissement de 1 W/m^2 : sur l'échelle du galvanomètre, ces $12,5 \mu\text{V}$ correspondent à 1,85 graduations

et une graduation vaut alors $0,54 \text{ W/m}^2$. La sensibilité de la thermopile a-t-elle varié, ou bien s'agit-il d'une différence de résistance interne des galvanomètres utilisés par le fabricant et par nous-même ? Nous donnerons la valeur de $0,9 \text{ W/m}^2$, trouvée par comparaison directe, comme la plus probable, en précisant qu'il s'agit d'une indication et non pas d'une valeur absolue.

b/ La sensibilité du galvanomètre

Pour une mesure de f. é. m., l'erreur relative est donnée par le rapport de la résistance du générateur à celle du galvanomètre : elle est donc d'autant plus faible que la résistance du galvanomètre est plus grande par rapport à celle de la thermopile. Inversement, pour des raisons de structure interne, la thermopile a un rendement d'autant meilleur que la résistance du circuit externe est de valeur plus proche de sa résistance interne : il y a donc un compromis à trouver ; par ailleurs, le choix d'un galvanomètre de moindre résistance entraînerait une diminution de la sensibilité, puisqu'il existe une proportionnalité entre ces deux paramètres. Le galvanomètre à échelle mobile que nous utilisons (SEFRAM, type MOV3), possède une résistance de 1310 ohms, celle de la thermopile est de 53 ohms ; l'erreur relative sur la f. é. m. est donc faible : 4 %. Par ailleurs, la précision de lecture demeure très satisfaisante, l'échelle comportant 200 graduations dont on peut apprécier la cinquième partie.

3° Quelques exemples de sources lumineuses et d'instruments de mesure

Pour clore ce paragraphe de la mesure des grandeurs lumineuses, nous voulons passer en revue les différents types de sources lumineuses utilisés, et le matériel de mesure mis à contribution par les auteurs dont les travaux ont été exposés dans la première partie.

Comme sources de lumière blanche, les tubes fluorescents sont les plus employés :

- Tubes de 65 W (Osram HNT et HNW) (EBERHARD, RAU et ZEHENDER, 1960) : les éclairagements sont déterminés par une cellule photo-électrique.
- Tubes de 40 W "Cool white" (RILLING, 1962 ; BATRA et RILLING, 1964) : les éclairagements sont mesurés par un luxmètre Weston modèle 703.

En ce qui concerne les déterminations de spectres d'action, les auteurs ont employé des monochromateurs et des filtres interférentiels :

- Monochromateur Bausch et Lomb, équipé d'une lampe à arc au mercure de 200 W (RILLING, 1964) ; les éclairagements sont mesurés par une cellule photo-électrique (General Electric 8 PV IAAB), étalonnée par rapport à une thermopile.
- Monochromateur Zeiss M 4 Q II (RAU, 1966) équipé d'une lampe au xénon de 450 W (XB0) : les mesures sont réalisées par une thermopile Kipp et Zonen, type E₁.
- Filtres interférentiels Earlier TFP, sélectionnant des bandes spectrales de 10 nm à partir de la lumière émise par une lampe au xénon-mercure de 1000 W. Un radiomètre "Kettering" mesure les éclairagements énergétiques (BATRA, 1970).

Citons également les valeurs requises de la lumen pour induire la pigmentation :

- en lumière blanche, RAU (1960) indique que, chez *Fusarium aquaeductuum*, une pigmentation saturante est obtenue par 4 h d'illumination avec un éclairage de 12000 lux,
- en lumière monochromatique, nous avons cité en première partie de ce travail, quelques valeurs de la lumen caractérisant à la fois les exigences qualitatives et quantitatives des micro-organismes (chapitre II, paragraphe C/, 1°).

C/ Modifications apportées à l'appareil de série

1° Contrôle quantitatif de la lumière

Il s'agit, d'une part de pouvoir faire varier les éclairagements au niveau des échantillons, et d'autre part d'être en mesure d'égaliser les énergies relatives aux diverses tranches spectrales.

Ce sont les plaques photographiques qui nous apparaissent le meilleur moyen de contrôle : faciles à réaliser et à manipuler, il est possible de plus de leur donner, par une exposition judicieuse, n'importe quel pourcentage de transmission entre 0 et 90. Les manipulations envisagées n'exigent qu'un nombre limité de plaques : une dizaine de valeurs d'éclairément différentes, toutes choses étant par ailleurs constantes, suffiront pour chercher le seuil de sensibilité de l'échantillon à tester.

Nous avons, donc entrepris d'impressionner des plaques ; nos essais préliminaires ont été décevants, car malgré différents dispositifs d'éclairage, direct ou indirect, avec des durées et des intensités variées, nous ne pouvions obtenir des plaques homogènes de façon reproductible. Finalement, l'homogénéité a été obtenue par une imbibition de la couche sensible avant l'exposition, qui facilite probablement les réactions chimiques dans la couche de gélatine. La non-reproductibilité provenait de ce que les plaques étaient développées une par une ; dans l'intervalle, nous avons constaté que les plaques utilisées (Guilleminot, Panchro anti-halo, 6 X 9) présentaient un pic d'absorption dans le visible, due à la couche anti-halo. Or, en cherchant un système de développement des plaques en série, nous avons eu l'occasion de nous servir de l'équipement photographique d'un microscope électronique (*), qui résolvait tous les problèmes : l'exposition des plaques est très strictement contrôlée et le développement par séries de douze, en chambre climatisée, assure la reproductibilité des expériences ; en effet, deux plaques différentes, obtenues à quelques jours d'intervalle avec les mêmes caractéristiques d'exposition et de développement, ont respectivement des pourcentages de transmission de 20,3 et 20,8. De plus, les plaques utilisées (Scientia Gevaert, 23 D 50, 6 X 9) ne présentent pas d'absorption dans le visible.

Le pourcentage de transmission des plaques réalisées est mesuré par la thermopile, avec, comme source lumineuse, l'appareil de projection ; le tableau ci-dessous reproduit les valeurs obtenues, indépendantes par ailleurs de la composition spectrale de la source :

numéro des plaques	1	2	3	4	5
pourcentage de transmission	0,1	4,5	20,3	20,8	28,5
numéro des plaques	6	7	8	9	10 (**)
pourcentage de transmission	42,1	47,2	56	65	88

(*) Microscope Philips E.M. 300 du Centre de Microscopie électronique appliquée à la Biologie de LYON

(**) La plaque 10 a été développée sans avoir été impressionnée.

Voici donc le moyen de contrôler l'énergie reçue par l'échantillon ; quant à l'aspect pratique, les filtres gris, comme les filtres interférentiels, sont portés par une pièce spéciale, fixée à l'extrémité de l'objectif de projection et réalisée à notre demande par les établissements PETER.

2° Contrôle qualitatif de la lumière

Pour constituer l'élément "source lumineuse", nous avons choisi, comme il a été vu plus haut, l'ensemble source à incandescence-filtres colorés. Ces filtres, de deux types, nous permettent d'isoler, soit une large portion du spectre visible (filtre d'absorption en gélatine, KODAK WRATTEN), soit une bande très étroite de longueur d'onde définie (filtres interférentiels BALZER, type B 40) (planche 11, figure 2). Grâce aux filtres de gélatine, on caractérise la portion du spectre visible responsable de la pigmentation : d'emploi courant en photographie, ils ne posent pas de problèmes techniques à l'utilisateur. Leurs caractéristiques, ainsi que celles des filtres interférentiels, sont réunies dans les tableaux V et VI (planche 10).

Les filtres interférentiels, au contraire, avec une largeur de bande de 10 nm pour 20 % de transmission, mettent en évidence la réponse d'un organisme à un stimulus très précis, et permettent d'établir le spectre d'action du mécanisme étudié. Pour travailler dans de bonnes conditions, ces filtres exigent un faisceau de lumière parallèle, perpendiculaire à la surface d'absorption : le pourcentage de transmission décroît très rapidement dès qu'augmente l'angle formé par la direction du faisceau et la normale à la surface d'absorption ; de même, les caractéristiques spectrales du faisceau transmis changent avec cet angle : c'est tout le problème optique que nous allons aborder maintenant.

3° L'optique

Nous avons vu que, dans le projecteur de diapositives, l'ensemble miroir-source-condenseur fournit un flux approximativement parallèle : or ce n'est pas le but du fabricant. Son intérêt est de concentrer le maximum de lumière sur le plan de la diapositive, pour obtenir l'éclairement le plus intense et le plus homogène à ce niveau : l'objectif de projection n'intervient que pour donner une image réelle de ce plan de grande luminosité. De fait, la dispersion devient très importante après le plan de la diapositive. Pour nous, l'objectif de projection se présente comme un moyen de récupérer de l'énergie et de la concentrer sur la surface de projection. L'appareil est livré avec un objectif à focale variable (85 à 135 mm) : avec un tel objectif, la quantité d'énergie qui traverse le filtre interférentiel peut être suffisante, mais le faisceau est nettement divergent. Nous avons schématisé sur la figure 3 (planche 12) le fonctionnement théorique du projecteur : l'angle $\alpha = (BC, BB')$ donne un ordre de grandeur de cette divergence ;

$$\text{On a } \quad \text{tg } \alpha = \frac{B'C}{B C}$$

En mesurant la largeur du cercle lumineux projeté à 1 m de la source, avec, à la place de la diapositive, un diaphragme circulaire de 16 mm de rayon, et une focale de 85 mm, l'angle vaut 10° (tableau VII, planche 13).

Il est évident que l'on peut réduire cet angle par l'augmentation de la focale de l'objectif ; nous avons donc remplacé l'objectif de série par un objectif de 250 mm de focale : dans les mêmes conditions de mesure, le calcul donne pour α une valeur de 4°. Parallèlement, le gain d'énergie n'est pas négligeable.

PLANCHE 10

TABEAU V

Caractéristiques spectrales des filtres de gélatine

Couleur	Transmission supérieure à 3 %
n° 64 Bleue	de 450 à 570 nm et au dessus de 740 nm
n° 56 Verte	de 490 à 600 nm et au dessus de 720 nm
n° 29 Rouge	au dessus de 610 nm

TABEAU VI

Caractéristiques spectrales des filtres interférentiels

* λ_1 (nm.)	** λ_2 (nm.)	largeur de bandes en nm pour une transmission de :		pourcentage de transmission pour λ_2
		3 %	10 %	
367	366	60	35	31
407	403	34	17	25
450	452	32	16	40
495	500	30	16	46
554	558	30	16	46

* λ_1 : longueur d'onde du maximum de transmission indiqué par le constructeur
* * λ_2 : longueur d'onde de ce maximum mesurée en spectrophotomètre ultra-violet visible Perkin-Elmer 402

FIGURE 2

Transmission spectrale comparée d'un filtre interférentiel (1) et d'un filtre d'absorption en gélatine (2)

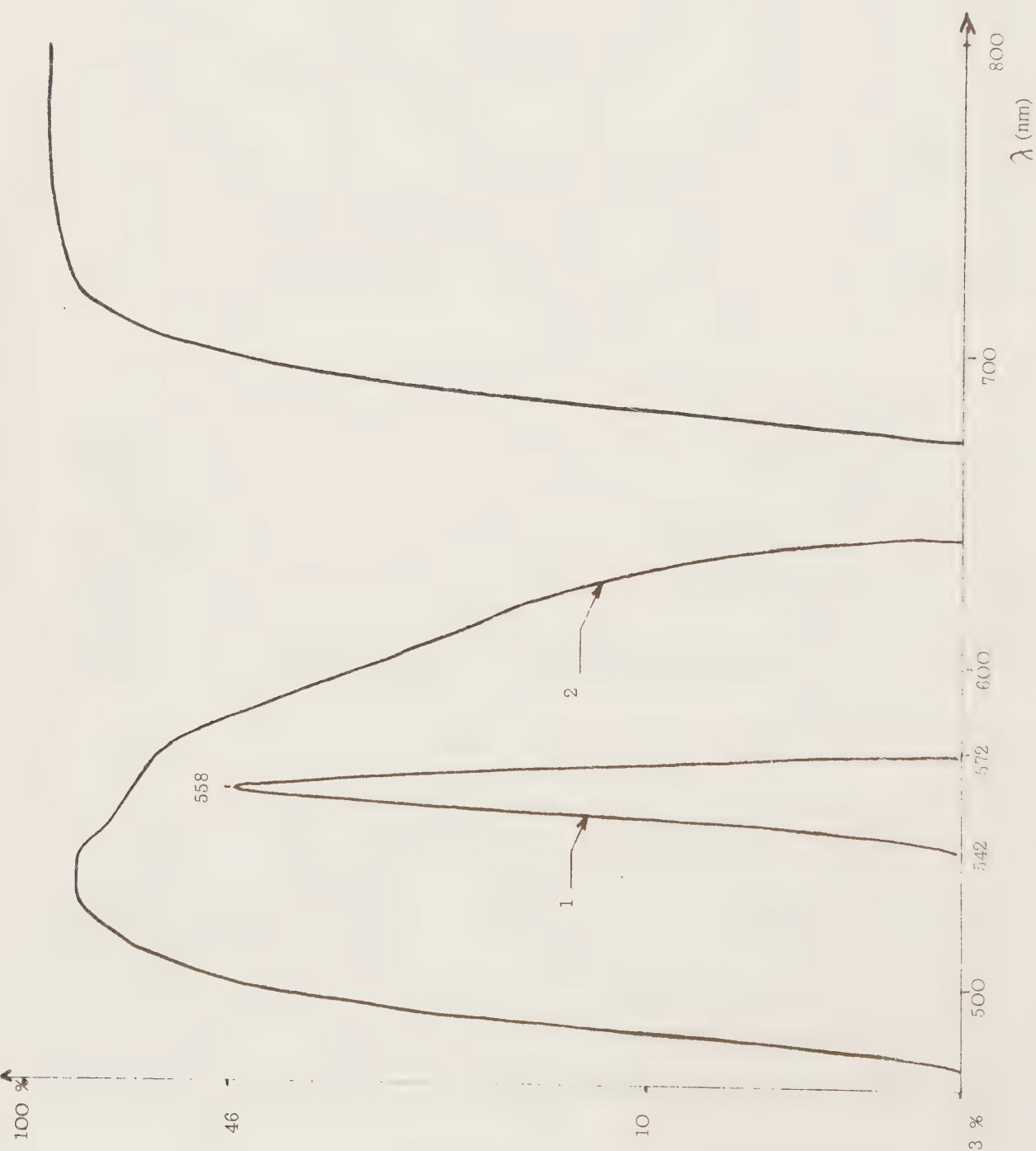


FIGURE 3

Influence de la focale de l'objectif de projection sur l'angle du faisceau lumineux avec l'axe optique.

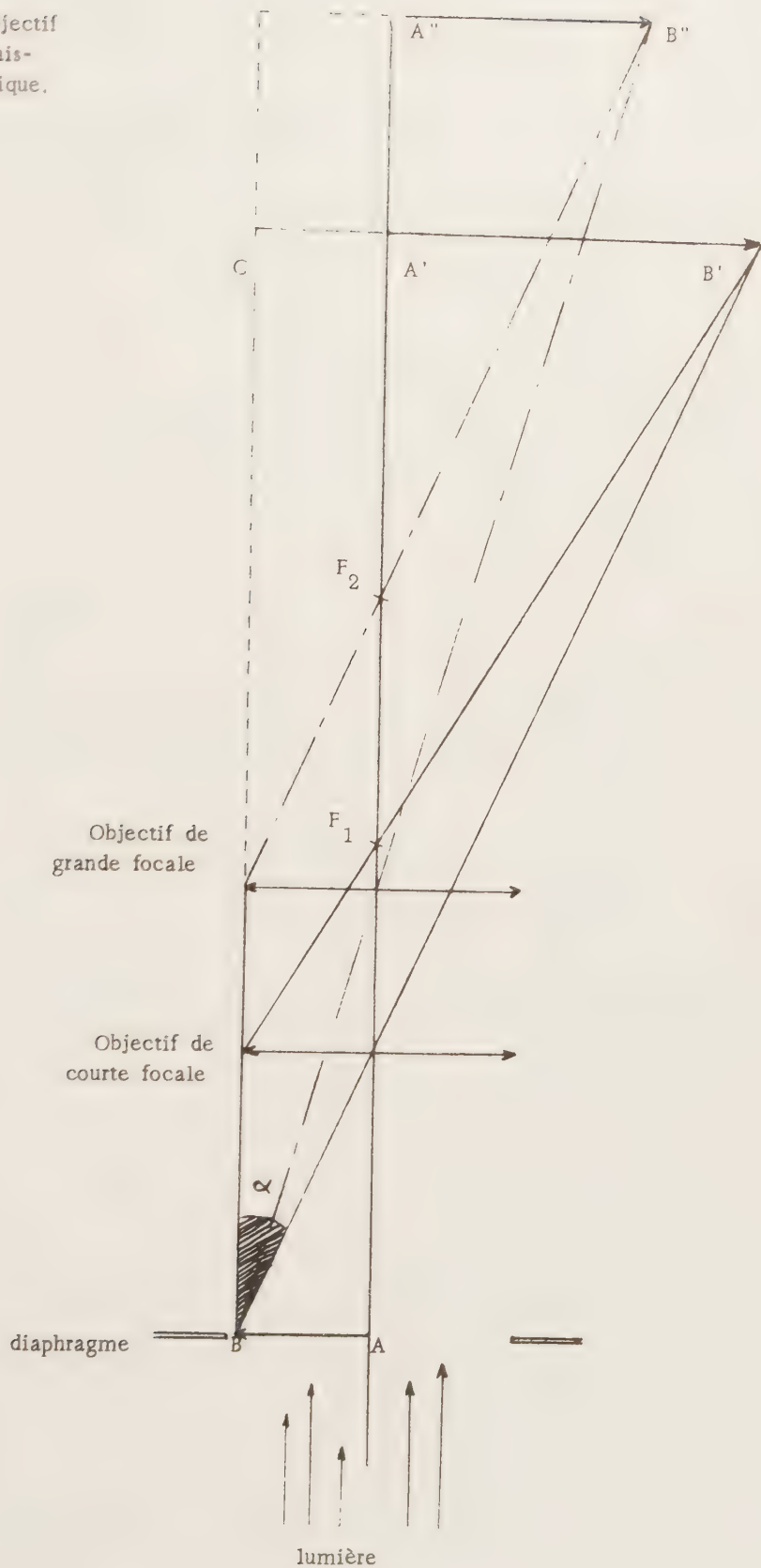


PLANCHE 13

TABEAU VII

Influence de la focale de l'objectif de projection sur l'angle α de divergence du faisceau et sur la valeur de l'éclairement mesuré à 1 m. de la source

focale de l'objectif en (mm)	surface éclairée en m ²	éclairement en W/m ²	α
85	804 x 10 ⁻⁴	18	10°
135	320 x 10 ⁻⁴	41	6°
250	92 x 10 ⁻⁴	178	4°

TABEAU VIII

Constitution d'un spectre d'émission simplifié d'une source à incandescence usuelle au moyen de filtres interférentiels

λ_1 du filtre interférentiel (nm.)	éclairement en W/m ²	pourcentage de transmission
367	0,45	0,15
407	0,8	0,30
450	2,1	0,70
495	3,7	1,30
554	5,4	1,80

N.B. : toutes les mesures ont été effectuées avec une lampe à incandescence de 500 W (Osram G 17 Q)

PLANCHE 14

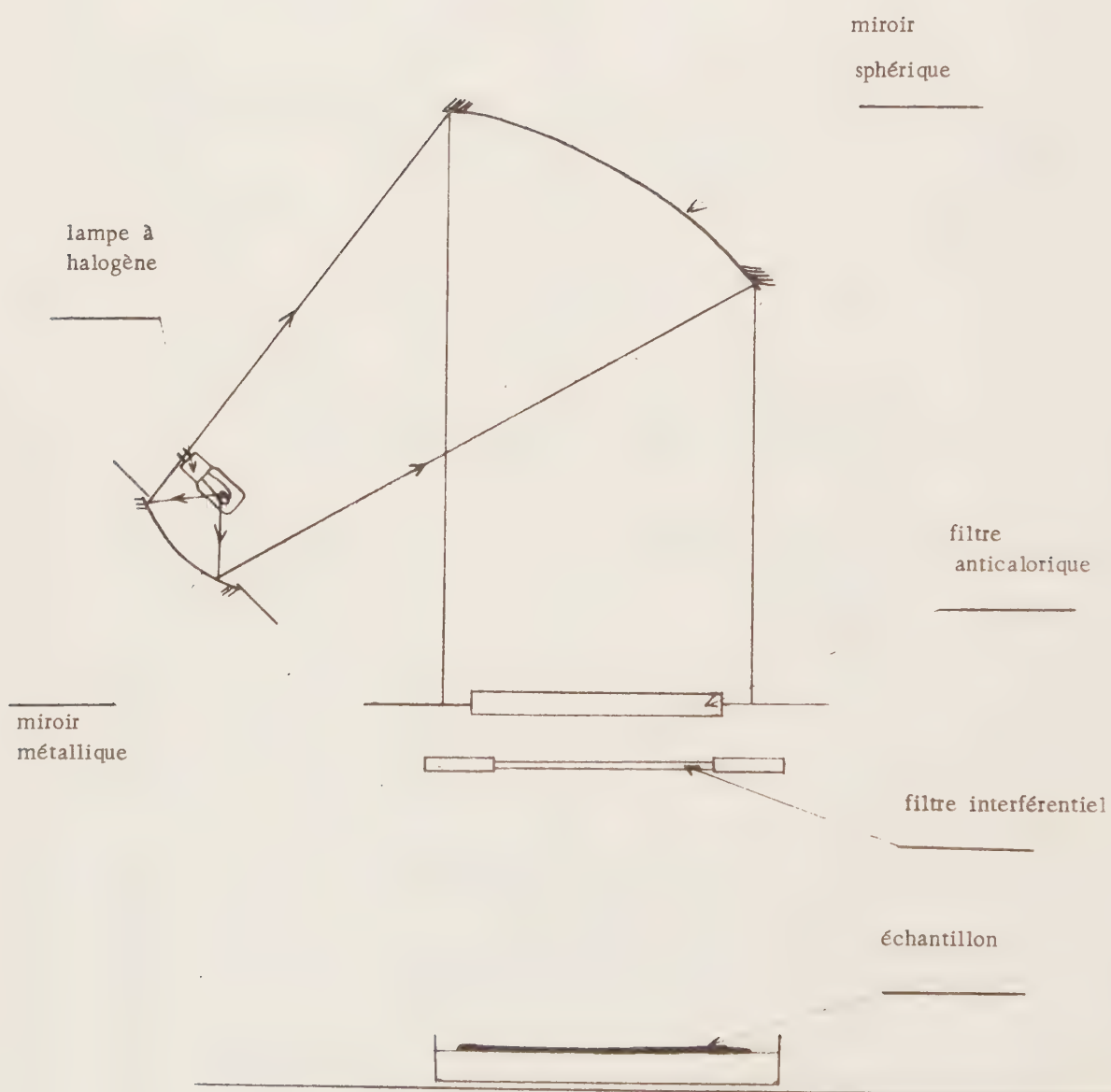
TABEAU IX

Comparaison de la composition spectrale de divers
dispositifs d'éclairage

¹ du filtre interférentiel (nm.)	pourcentage de transmission du filtre interférentiel selon la source considérée		énergie ² en W/m ²	
	projecteur de diapositives lampe à incandes- cence de 500 W	lampe à halogène	Dispositif simplifié et lampe à halogène	
367	0,15	0,2	0,25	1,45
407	0,30	0,4	0,25	1,3
450	0,7	0,9	0,7	3,2
495	1,3	1,5	1,1	5,6
554	1,8	2,1	1,3	8,5

FIGURE 4

Dispositif simplifié



4° Le problème de l'énergie à la limite de l'ultra-violet

Un nouveau problème surgit, mis en évidence dans le tableau VIII, planche 13 : nous avons réalisé, en première approximation, le spectre d'émission de la source lumineuse (✕) et mis en évidence sa pauvreté en radiations de courtes longueurs d'onde ; le rapport du pourcentage de transmission du filtre ultra-violet à celui du filtre 554 nm nous donne la meilleure indication à ce sujet. Il est, dans le cas présent, égal à 0,08. Or, pour réaliser un spectre d'action à énergie constante, il faudra ramener l'énergie à la valeur obtenue derrière le filtre ayant le plus faible pourcentage de transmission, c'est-à-dire le filtre ultra-violet. Cette énergie ($0,45 \text{ W/m}^2$) est probablement insuffisante et l'erreur de mesure est très grande, de l'ordre de 20 %, puisque cet éclairage énergétique correspond à une demi-graduation de notre galvanomètre, dont on peut apprécier la cinquième partie.

Aussi, avant même de déterminer un spectre d'action, avons-nous remplacé la source à incandescence classique par une lampe à halogène(**), dont le spectre d'émission est enrichi en bleu ; les halogènes interviennent pour améliorer le rendement énergétique de la lampe et augmenter sa température de couleur : le spectre d'émission est décalé vers les courtes longueurs d'onde.

Si l'on se reporte au tableau IX, planche 14, on voit que l'enrichissement en bleu n'est pas très sensible : le rapport des énergies entre le bleu et le vert passe de 0,08 à 0,1. Il faut rappeler que les pertes de flux par réflexions sur les diverses surfaces optiques sont importantes ; de plus, l'absorption des radiations de courtes longueurs d'onde par le verre n'est pas négligeable, particulièrement dans le filtre anticalorique à la limite de l'ultra-violet. Pour tourner la difficulté, nous avons recouru à un montage simplifié (planche 15, figure 14), sans condenseur ni objectif, supprimant bon nombre de surfaces réfléchissantes : il est évidemment impossible d'enlever le filtre anticalorique. On conserve le miroir métallique du projecteur, et l'ensemble source-miroir métallique est placé au foyer d'un miroir sphérique qui donne un faisceau approximativement parallèle : le rapport des énergies, précédemment défini, passe de 0,1 à 0,2 avec la lampe à halogène. Le gain d'énergie est aussi appréciable, puisque la valeur de base, c'est-à-dire l'énergie recueillie derrière le filtre ultra-violet passe de 0,4 à $1,4 \text{ W/m}^2$.

Malheureusement, ce gain d'énergie se fait aux dépens de la qualité du faisceau, qui perd en partie son parallélisme et surtout son homogénéité : la source, quoiqu'assez petite, n'est pas ponctuelle.

Nous avons cependant utilisé ce montage avec succès, puisqu'il nous a permis d'obtenir un spectre d'action préliminaire de la pigmentogénèse d'une bactérie, comme nous allons le voir dans la troisième partie de cet exposé. Pour les essais dans lesquels n'interviennent pas les filtres interférentiels, c'est le projecteur qui sera mis à contribution, les qualités optiques du faisceau étant nettement supérieures.

(✕) lampe à incandescence de 500 W, Osram G 17 Q

(**) lampe sylvania quartz-iode ; 24 V, 250 W.

CHAPITRE III

Elément d'irradiation

Deux des trois éléments de notre appareillage sont déjà décrits : ils conditionnent la forme du troisième, l'élément d'irradiation. Nous avons vu que cet élément doit recevoir un fluide dont la température est régulée par le premier élément : il est muni à cet effet d'une double enveloppe permettant la circulation de ce fluide. Il doit de plus utiliser le flux lumineux traité par le deuxième élément : un hublot, placé à la partie supérieure de l'élément, satisfait cette exigence.

Mais l'élément d'irradiation a été conçu pour répondre à deux autres impératifs de fonctionnement : stérilité et possibilité d'atmosphère artificielle. Enfin, il a été étudié pour recevoir de petits échantillons, et en premier lieu, des cultures de micro-organismes, d'où la forme cylindrique de l'appareil dont le dessin et les caractéristiques techniques sont rassemblés dans la planche 16, figure 5.

Le diamètre du cylindre a été choisi de façon à recevoir une boîte de Petri du modèle courant (diamètre : 10 cm) et la hauteur telle qu'un petit échantillon végétal puisse y trouver place. Les évents, dans lesquels on place des filtres de coton, assurent le remplacement de l'air par l'atmosphère de notre choix ; l'ensemble, en acier inoxydable avec des joints de caoutchouc synthétique, est facilement stérilisable, et sa petite taille permet des manipulations en cage stérile.

Nous n'avons pas repris les expériences de RILLING et RAU sur l'influence de l'oxygène au moment de la photoinduction, notre travail ayant été essentiellement photobiologique : mais nous avons pu vérifier le bon fonctionnement du système de gazage (cf. l'inhibition de la pigmentation par les hautes énergies lumineuses, dans la troisième partie) et tirer profit de l'élément comme enceinte thermostatée dans la réalisation des spectres d'action.

Devis de l'ensemble de l'appareillage (1970)

Elément "source thermique"

- Source froide : bain-marie réfrigéré à circulation
F. 4060
Etablissement JOUAN, rue du plat, LYON (2°)
- Source chaude : thermostat assistant F. 570
Comptoir Lyonnais de Verrerie, 106, Avenue F. de Pressensé, Villeurbanne

Elément "source lumineuse"

- projecteur de diapositive : Automalik 304
F. 452
- un miroir et son support : F. 72
- cinq montures de filtres interférentiels F. 410
- un porte-filtre : F. 380
aux établissements PETER, opticien, 2, place Bellecour, LYON (2°)
- filtres de gélatine : Kodak WRATTEN n° 29, 56 et 64
F. 8,37
Société KODAK, 35, rue de l'abondance, LYON (3e)
- Filtres interférentiels : Balzer type B 40, cinq filtres
F. 800
Etablissement WILD, 80, rue Hénon, LYON (4°)
- Objectif de projection : Carrousel, 250 mm de focale
Kodak F. 750
Etablissement CINEPHOT, 5, Cours Gambetta, LYON (3°)

Elément d'irradiation

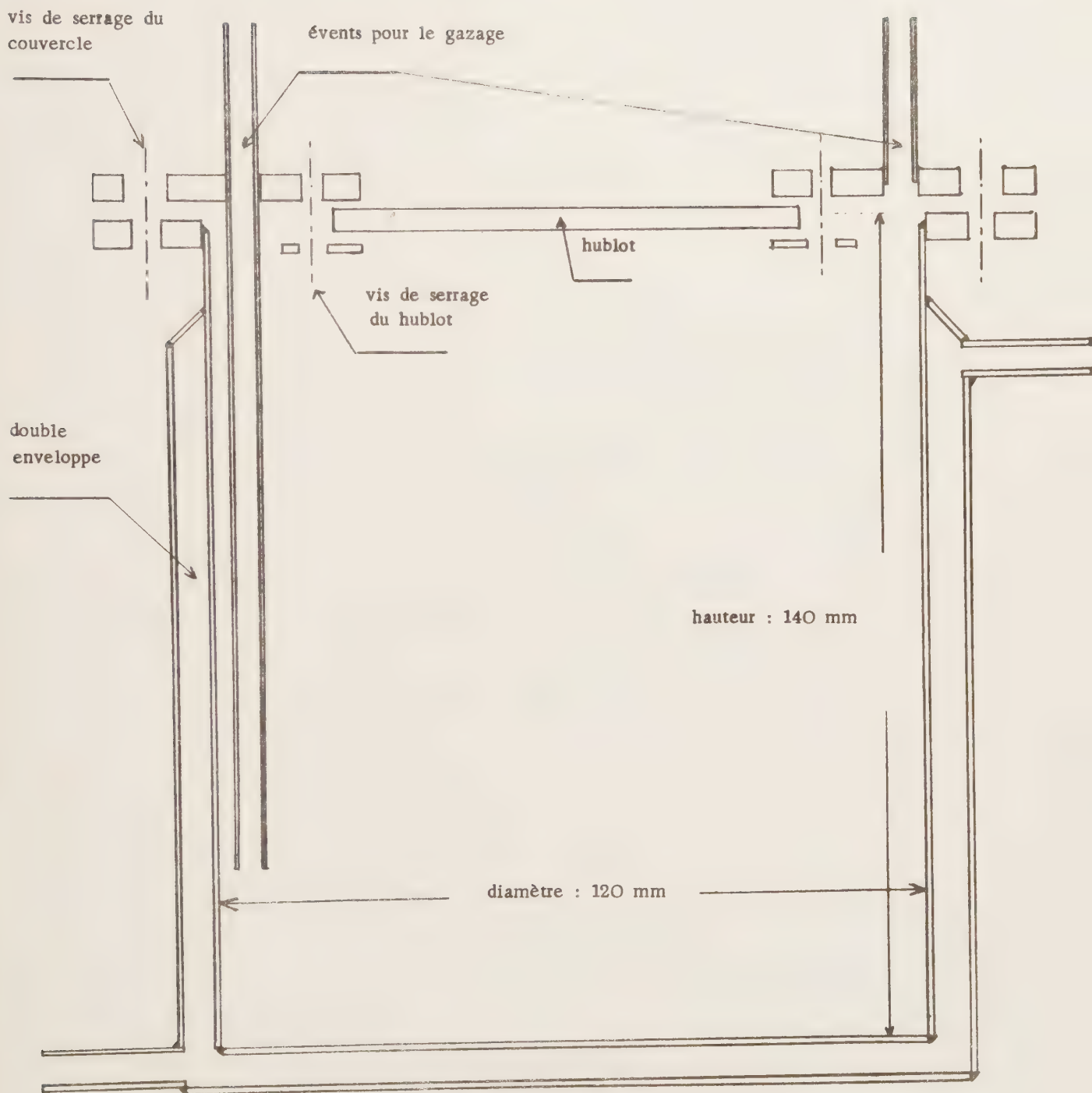
- Fabrication de la chambre claire en acier inoxydable par les
Etablissements CHABANOL de Villeurbanne
F. 600

Coût global de l'appareillage (T.T.C.) : F. 8100

N.B. : Le devis d'ensemble de l'appareillage peut paraître assez élevé ; nous tenons à faire remarquer que plus de la moitié du coût global relève de l'élément "source thermique." Il s'agit d'un équipement non spécifique, en ce sens qu'il peut être employé à de toutes autres fins et doit faire partie de l'équipement de base des laboratoires de Biologie.

FIGURE 5

Elément d'irradiation



Caratéristiques de l'appareil :

diamètre intérieur : 120 mm
diamètre hors tout : 180 mm
volume utile : 1 litre environ
surface éclairée : 38,5 cm²
poids : 3 kg

TROISIEME PARTIE

Essais du micro-illuminateur spectral.

Etude de la photosensibilité de la pigmentation

chez Arthrobacter sp.

Exposons tout d'abord dans quel esprit nous avons réalisé les expériences décrites dans cette troisième partie : nous voulions en priorité démontrer les possibilités de l'appareil et mettre en évidence ses limites ; nous ne nous sommes donc pas lancé dans des investigations originales, mais au contraire, d'après les résultats acquis par les auteurs cités en première partie de ce travail, nous avons cherché à réaliser des schémas expérimentaux précis et déjà connus dans leur principe.

L'idée directrice a été l'obtention d'un spectre d'action de la lumière sur la caroténogénèse d'un micro-organisme. Les difficultés, pour l'expérimentateur, sont de deux ordres :

- le choix du micro-organisme, objet de l'expérimentation,
- la mise au point de techniques de culture appropriées aux divers modes d'expérimentation et à l'appareillage.

CHAPITRE I

Les techniques d'expérimentation

A/ Le choix du micro-organisme

La réussite de toute étude physiologique dépend essentiellement du choix du sujet d'expérience. Ce choix, déjà limité par la nature du mécanisme étudié, est en outre guidé par trois critères :

- la stabilité génétique et physiologique de l'organisme, assurant la reproductibilité des expériences,
- La vitesse avec laquelle s'effectue la croissance du sujet : une croissance rapide, en permettant de répéter les expériences à volonté et de relier immédiatement les effets aux causes, est un atout considérable.
- La capacité de l'échantillon de synthétiser des pigments en quantité suffisante pour une mesure caractéristique de l'effet physiologique.

Nous avons étudié trois micro-organismes : deux Bactéries psychrophiles du genre Arthrobacter et un Champignon de la famille des Sporobolomycétacées, Sporidiobolus johnsonii.

Sporidiobolus johnsonii NYLAND (1949), est une "fausse levure" de la famille des Sporobolomycétacées dont l'habitat naturel n'est pas déterminé. La couleur rose des colonies résulte du mélange d'un caroténoïde rouge, la torularhodine, élément majeur du contenu pigmentaire et de trois carotènes, torulène, β -carotène et α -carotène (FIASSON, 1967).

En milieu liquide, la teneur en caroténoïdes est de 0,14 %; en milieu solide, la croissance dure une semaine et la teneur est de 0,31 %. Les pigments sont extraits par le diméthylformamide. Toutes les expériences sur cette levure ont été réalisées en collaboration avec M. FIASSON.

Arthrobacter glacialis, psychrophile stricté décrite par MOIROUD et GOUNOT (1969), est un hôte des sols froids et se rencontre au voisinage immédiat des glaciers. Sa température optimale de croissance se situe aux environs de +15° C et l'obtention d'une colonie bien développée sur milieu riche gélosé demande une dizaine de jours : la teneur en caroténoïdes à l'obscurité est de 0,5 % en poids et de 1,6 % à la lumière. Les pigments sont extraits facilement selon le schéma décrit ci-dessous pour Arthrobacter sp.. La structure du pigment majeur fait actuellement l'objet d'une étude originale.

Arthrobacter sp., (leg. GOUNOT), espèce non décrite, est une psychrophile facultative découverte dans un sol de grotte. Les cellules présentent le caractère polymorphe des Arthrobacter, en forme de bâtonnet parfois ramifiés dans les colonies jeunes, se transformant en cocci

dans les colonies âgées. Cet Arthrobacter, proche de A. aurescens selon BERGEY (1957, 7ème ed.) par la couleur jaune que prennent les colonies exposées à la lumière, en diffère cependant par quelques caractères physiologiques (non croissance à 38° C) et biochimiques (non hydrolyse de l'amidon).

Les pigments, au nombre de trois d'après des analyses préliminaires, représentent des structures nouvelles : il s'agirait de caroténoïdes en C₅₀ à chromophore de type ϵ -carotène ; le moins polaire d'entre eux serait une xanthophylle dihydroxylée et les deux autres, des dérivés glycosylés de cette molécule. Ils sont extraits facilement par le méthanol après déshydratation par l'acétone. La teneur en carotènes atteint 0,5 µg par mg de poids sec de bactéries en milieu solide à la lumière et à +25° C : à cette température, le rendement maximum en poids est obtenu en deux jours. Nous n'avons jamais observé de pigmentation dans les colonies maintenues à l'obscurité.

Nous avons concentré notre travail sur cette dernière espèce, choisie pour sa rapidité de croissance et sa capacité de synthèse élevée.

Le dosage photocolorimétrique des pigments produits exprime les résultats de l'expérience avec un faible pourcentage d'erreur, et les différents paramètres actifs sur le phénomène (pH, température, qualité et quantité de lumière) sont mesurés avec une assez grande précision. Par contre la croissance des micro-organismes est un phénomène complexe et difficile à contrôler. Malgré un protocole expérimental très précis chez Arthrobacter sp., espèce pourtant favorable de ce point de vue, il subsiste une incertitude sur le poids maximum de la colonie obtenue en milieu solide ; il est probable que la méconnaissance de certaines exigences de la bactérie, concernant la quantité ou la qualité de l'inoculum, en est la cause.

B/ Les techniques de culture

1° Le choix du mode de culture

Deux possibilités se présentent quant aux modes de culture : milieu liquide et milieu solide. Avec le second mode, la standardisation est plus difficile à obtenir qu'avec le premier, mais la technique, une fois définie, demande un moins grand nombre de manipulations ; de plus, le matériel utilisé est réduit par rapport à celui qu'exige une culture en milieu liquide : un fermenteur d'assez grande capacité, pour l'obtention d'une série d'échantillons suffisamment importante, et un système d'oxygénation ou d'agitation rapide indispensable lors de l'illumination. Un tel procédé convient particulièrement aux études à long terme ; pour l'étude à court terme envisagée, nous avons préféré la culture en milieu solide.

2° Les milieux utilisés

La souche d'Arthrobacter sp. est maintenue sur un milieu de conservation semi-solide sur lequel elle garde sa vitalité pendant un mois : les repiquages ont d'abord été faits directement à partir de ce milieu sur un milieu liquide riche utilisé pour la préculture de l'expérience. La quantité de l'inoculum étant difficile à contrôler, nous avons adopté le processus suivant : passage de la souche-mère sur un milieu semi-solide, puis repiquage à partir de cette culture jeune dans un milieu liquide peu enrichi (milieu Y.S. de LOCHHEAD modifié). Ce milieu liquide constitue la préculture à partir de laquelle sont ensemencées les boîtes de Pétri utilisées dans les expériences décrites. Tous les repiquages ont lieu au cours de la phase active de croissance. La composition des milieux utilisés est la suivante :

- milieu semi-solide : extrait de terre 1000 ml
- extrait de levure (DIFCO) 1 g.
- phosphate bipotassique 0,2 g.
- gélose (DIFCO) 3 g.

- milieu liquide Y.S. de LOCHHEAD modifié :

K_2HPO_4	1 g.
KNO_3	0,5 g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g.
$CaCl_2$	0,1 g.
$NaCl$	0,1 g.
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,01 g.
H_2O distillée	q. s. p. 1000 ml

Le pH étant ajusté à 6,8 on ajoute 1 g. de glucose. A 500 ml de ce milieu de base glucosé, on ajoute :

"Vitamin free casamino- acids" (DIFCO)	3 g.
extrait de levure	0,75 g.
extrait de terre	500 ml

- milieu riche solide pour les boîtes de Pétri : (MULDER et ANTHEUNISSE, 1963)

extrait de levure	7 g.
glucose	10 g.
gélose	15 g.
pH = 7	

Le temps de génération d'Arthrobacter sp. a été déterminé au biophotomètre (marque BONNET-MAURY et JOUAN) au cours de la phase exponentielle de croissance en milieu liquide de préculture à +26° C : il est de 1 heure et demi environ (les conditions d'agitation et d'aération étant très différentes de celles que nous utilisons, cette valeur n'est citée qu'à titre indicatif).

Nous avons cherché également une correspondance en milieu liquide entre le poids sec et la densité optique de la culture (il s'agit là encore d'une approximation, du fait que parfois la bactérie pousse en grumeaux) : la densité optique maximale obtenue est de 5 et correspond à 5,5 mg de poids sec de bactéries par cm^3 .

Pour Arthrobacter glacialis et Sporidiobolus johnsonii, le protocole général de culture est identique, seules changent température de croissance et composition des milieux (*).

(*) Voici la composition des milieux solides pour

<u>Arthrobacter glacialis</u>		<u>Sporidiobolus johnsonii</u>	
Glycérol	2 g.	Extrait de malt	7 g.
glucose	2 g.	glucose	10 g.
extrait de levure	1 g.	K_2HPO_4	1 g.
phytone	6 g.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g.
gélose	15 g.	$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g.
		gélose	15 g.

H_2O q.s.p. 1000 ml
pH voisin de 7

3° Déroulement du processus expérimental (*Arthrobacter* sp.)

La préculture sur milieu liquide est réalisée en tubes à essais pour un volume de $1,5 \text{ cm}^3$: à $+22^\circ \text{ C}$, sur plateau agité, la densité optique maximale est atteinte 20 h. après l'ensemencement. Un volume déterminé ($0,2 \text{ cm}^3$) de la préculture, étalé stérilement à la surface de la gélose, conduit en 48 h. à $+25^\circ \text{ C}$, à la formation d'une colonie dont le poids sec est de 180 mg en moyenne (courbes de croissance et de pigmentation, 13 à 15, planche 17).

Pour toutes les expériences décrites dans cette troisième partie, nous avons décomposé la période de culture sur milieu solide en trois étapes :

- étape d'incubation pré-illuminatoire de 23 h. à partir de l'ensemencement, à $+25^\circ \text{ C}$ en étuve, à l'obscurité complète,
- étape d'illumination d'une durée de 10 h. à $+25^\circ \text{ C}$, avec des conditions variées de niveaux d'éclairement et de durée d'illumination,
- étape d'incubation post-illuminatoire de 16 h. à $+25^\circ \text{ C}$ en étuve, à l'obscurité complète.

Ce schéma expérimental a été retenu après de nombreux essais et correspond à un compromis entre deux exigences antagonistes : une période d'illumination minimale et une quantité maximale de bactéries illuminées. A la fin de l'étape post-illuminatoire, les bactéries sont récoltées à la surface de la gélose et desséchées par l'acétone (20 cm^3 par boîte de Pétri) : après filtration de l'extrait acétonique, les caroténoïdes, entraînés par 30 cm^3 de méthanol, sont dosés par spectrophotométrie à 440 nm, maximum d'absorption de l'extrait global (spectrophotomètre ultra-violet visible Perkin-Elmer, modèle 402). La quantité de caroténoïdes est exprimée en μg par le facteur

$$\frac{V \times \text{D.O.} \times 10^{+4}}{E \begin{matrix} 1 \% \\ 1 \text{ cm} \end{matrix}}$$

où V représente le volume de la solution photométrée, en ml, D.O. sa densité optique, $E \begin{matrix} 1 \% \\ 1 \text{ cm} \end{matrix} = 2500$ l'absorption spécifique moyenne des caroténoïdes.

A titre indicatif, nous donnerons les erreurs estimées sur la détermination de la pigmentation dans une série expérimentale destinée à vérifier la loi de réciprocité (tableau XII, planche 25, éclairage de 10 W/m^2), il convient de distinguer l'erreur sur le dosage proprement dit, de l'incertitude qui existe sur la croissance de la bactérie.

La première erreur est celle réalisée sur la lecture de densité optique : malgré la précision de l'appareillage, elle ne peut être inférieure à 0,005 de densité optique, ce qui, pour une mesure moyenne de 0,1, correspond à une erreur relative de 5 % ; comme le dosage des pigments du témoin en lumière continue, que nous utiliserons pour toutes les mesures de pigmentation relative est entaché de la même erreur, tous les pourcentages de pigmentation des essais par rapport aux témoins seront donnés avec une erreur relative de 10 %. L'erreur commise sur la lecture des volumes photométrés est négligeable par rapport à cette dernière.

La deuxième imprécision peut être évaluée d'après les écarts à la moyenne d'une série de témoins en lumière continue, ayant reçu pendant 10 h. un éclairage de 10 W/m^2 .

numéros des essais	1	2	3	4	moyenne
pigmentation en g de caroténoïdes par boîte de Pétri	28,4	27,9	27,7	29,9	28,5
écart à la moyenne	- 0,3 %	- 2,1 %	- 2,8 %	+ 5 %	0

L'imprécision sur la croissance est donc, à l'intérieur d'une même série, inférieure à l'erreur de dosage : nous avons donné l'exemple d'une série homogène quant à la croissance des différents essais : dans des expériences antérieures, avec la même technique de culture, nous obtenions des variations importantes de la croissance d'une série à l'autre ; comme nous nous en sommes rendu compte par la suite, il s'agissait essentiellement de standardiser les différentes manipulations du protocole expérimental décrit.

De plus, après avoir constaté que les pigmentations et les croissances des colonies, pour une série de boîtes ensemencées en même temps, étaient toujours homogènes, nous avons préféré ramener la quantité de caroténoïdes produits à la boîte de Petri, considérée comme unité physiologique, plutôt qu'au poids sec de la colonie, en prenant la précaution d'avoir toujours à l'intérieur de chaque série, deux témoins recevant la lumination conduisant à une caroténogénèse maximale. Pour illustrer cette technique, nous donnerons l'exemple de l'influence de la durée d'illumination sur la pigmentation ; pendant la période d'illumination précédemment définie, trois lots de deux boîtes reçoivent les traitements suivants :

- 1 - témoin lumineux : 10 h. d'éclairement à 10 W/m^2
- 2 - 1 h. d'éclairement à 10 W/m^2 , suivie de 9 h. d'obscurité
- 3 - 3 h. d'éclairement à 10 W/m^2 , suivies de 7 h. d'obscurité.

La production pigmentaire des essais 2 et 3 est exprimée en pourcentage de celle du témoin lumineux, 1 :

- | | |
|------------------------|-------|
| 1 - $36,7 \mu\text{g}$ | 100 % |
| 2 - $10,5 \mu\text{g}$ | 29 % |
| 3 - $20,5 \mu\text{g}$ | 56 % |

Cette technique remplace donc la mesure des poids secs par le dosage des caroténoïdes des témoins et permet d'avoir une référence physiologique pour chaque expérience ; nous aurions pu tout aussi bien relever les poids secs pour chaque expérimentation, mais nous avons renoncé à ce procédé parce que :

- le protocole expérimental se trouverait surchargé par une manipulation supplémentaire et la précision apportée par la mesure des poids ne serait guère exploitable compte tenu des imprécisions relatives au dosage et aux conditions de croissance ;
- de plus, et ceci nous paraît essentiel, les variations de l'état physiologique des bactéries entraînent des différences de pigmentation telles que les résultats obtenus ne peuvent pas toujours être comparés d'une expérience à l'autre, même raménés à poids sec égal.

CHAPITRE II

Résultats

Nous avons repris des schémas expérimentaux déjà connus dans leur principe : nous voulons déterminer, à l'aide de notre appareillage, si les effets physiologiques de la lumière, mis en évidence par ZALOKAR, BATRA et RILLING, RAU, se retrouvent identiques chez les micro-organismes que nous avons choisis pour notre étude.

Nous avons pour cela établi des courbes de croissance et de pigmentation à l'obscurité et à la lumière : puis nous avons essayé de définir les exigences quantitatives et qualitatives en lumière pour le déclenchement de la caroténogénèse. A part deux tentatives de spectres d'action chez Arthrobacter glacialis et Sporidiobolus johnsonii, toutes les expériences ont été réalisées sur Arthrobacter sp.

A/ Les exigences quantitatives en lumière

1° Cinétiques de croissance et de pigmentation

Arthrobacter sp. : un premier ensemble de courbes a été établi en conditions naturelles. La température moyenne étant de +25° C, les boîtes de Pétri ont été placées dès l'ensemencement derrière une fenêtre : les colonies reçoivent un éclairement moyen de 10 W/m², avec une alternance de jours et de nuits de durée égale. Chaque point des courbes 9 à 12 de la planche 17 représente la moyenne de trois dosages. Une série identique de boîtes, maintenues en chambre noire à la même température, permet de comparer les croissances à la lumière et à l'obscurité, mesurées d'après les poids secs : après l'extraction des pigments pour dosage, le résidu bactérien est mis à sécher à l'étuve à +65° C jusqu'à poids constant, déterminé sur une balance précise au dixième de milligramme.

Les graphes de la planche 17 nous fournissent les renseignements suivants :

- à l'obscurité, la synthèse des carotènes s'avère pratiquement nulle : pour une colonie pesant 120 mg (poids sec), elle est inférieure à 1 µg, limite de sensibilité du dosage,
- la maximum de croissance et de pigmentation est atteint en trois jours à la lumière : dans ce cas, la lumière semble ralentir la croissance ; cependant cet effet n'a pu être retrouvé, peut-être était-il dû à une technique de culture insuffisamment élaborée.

Nous avons en effet repris l'expérience en conditions contrôlées, après modification de la technique de culture (cf. Chap. I, B/, 2°) : température de + 24° C avec des variations inférieures à 1° C, éclairement continu de 10 W/m² fourni par deux tubes fluorescents blancs (CLAUDE, U40 RS, 1 lumière du jour de luxe et 1 blanc Z). Les courbes 13 à 15 de la planche 18 traduisent les résultats obtenus. La croissance et la pigmentation, mesurées toutes les trois heures entre

la 19ème et la 37ème heure après l'ensemencement, permettent de mieux connaître le comportement de la bactérie dans le laps de temps défini comme période d'illumination dans notre processus expérimental (c'est à dire de la 23ème à la 33ème heure) : cette période correspond à la phase de division active des cellules, quoique la croissance ne soit pas exponentielle.

Nous constatons d'ailleurs que la teneur en poids des pigments n'a pas varié par rapport à la première expérience : seule la croissance a été modifiée par le changement de technique, et le poids sec maximum de la colonie est passé de 120 à 180 mg.

Signalons un deuxième point intéressant : la teneur atteint d'emblée sa valeur maximale, et reste constante pendant la phase de division active ; contrairement à ce qui se passe chez Mycobacterium marinum (MATHEWS, 1963), elle ne semble pas augmenter durant la phase stationnaire de croissance. Ce fait, rapproché d'autres que nous citerons plus loin, nous incite à penser que la synthèse des pigments se fait à un rythme très rapide et suit la croissance avec un retard de quelques heures seulement.

Arthrobacter glacialis : les cinétiques de croissance et de pigmentation de cette bactérie à la lumière et à l'obscurité, données dans la planche 19, ont été obtenues dans les conditions suivantes : température de $+ 10^{\circ} \text{C} + 1^{\circ} \text{C}$ en étuve, éclairage énergétique de 8 W/m^2 avec des périodes de lumière et d'obscurité alternées de 12 h.. Le dosage des pigments et la mesure des poids secs sont faits dans les mêmes conditions que pour Arthrobacter sp.

De ces courbes, il ressort que :

- la teneur en caroténoïdes à l'obscurité atteint le tiers de celle mesurée à la lumière avec le rythme nycthéméral, 12 h/12 h,
- le maximum de croissance se situe entre le 6ème et le 8ème jour après l'ensemencement. La croissance paraît lente par comparaison avec celle d'Arthrobacter sp., mais il convient de rappeler que la vitesse de croissance est seulement divisée par trois alors que la température baisse de 15°C (le phénomène "croissance" semblant suivre ici la loi d'ARRHENIUS).
- autant qu'on peut en juger par le nombre relativement faible de points constituant les courbes, il n'y a pas de différence de croissance entre les colonies éclairées et celles gardées à l'obscurité : les maximums, de même valeur, sont atteints à la même vitesse, à un jour près.
- comme chez Arthrobacter sp., il ne semble pas exister de décalage entre les maximums de croissance et de pigmentation ; de plus, la teneur pigmentaire atteint rapidement une valeur stable.

Sporidiobolus johnsonii : les conditions expérimentales sont les suivantes : température de $+ 22^{\circ} \text{C}$ pour l'ensemble des essais, éclairage de 10 W/m^2 pour les essais à la lumière continue. De l'ensemble des résultats, traduits dans les courbes 22 à 26 de la planche 20, nous dégagerons les conclusions suivantes :

- la pigmentation à l'obscurité atteint, en teneur, les 2/3 de celle observée à la lumière ; de plus, les teneurs sont stables à partir du 8e jour,
- les croissances à l'obscurité et à la lumière sont identiques et les poids maximums des colonies atteints au bout de 10 jours environ,
- il est possible, mais non certain, qu'il y ait un décalage dans le temps d'une part entre les maximums de pigmentation à l'obscurité et à la lumière, d'autre part entre le maximum pondéral et le maximum de pigmentation à l'obscurité.

En résumé, le comportement de Sporidiobolus johnsonii ne se distingue pas nettement de celui des deux bactéries.

2° Détermination de la sensibilité à la lumière

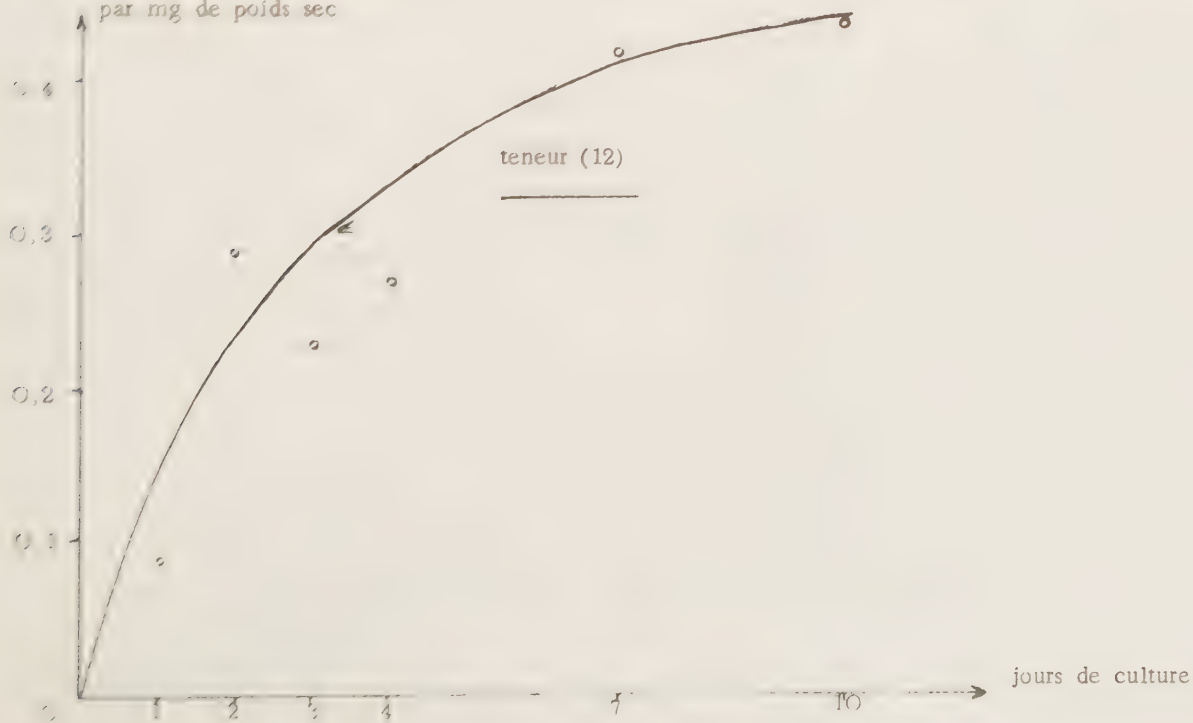
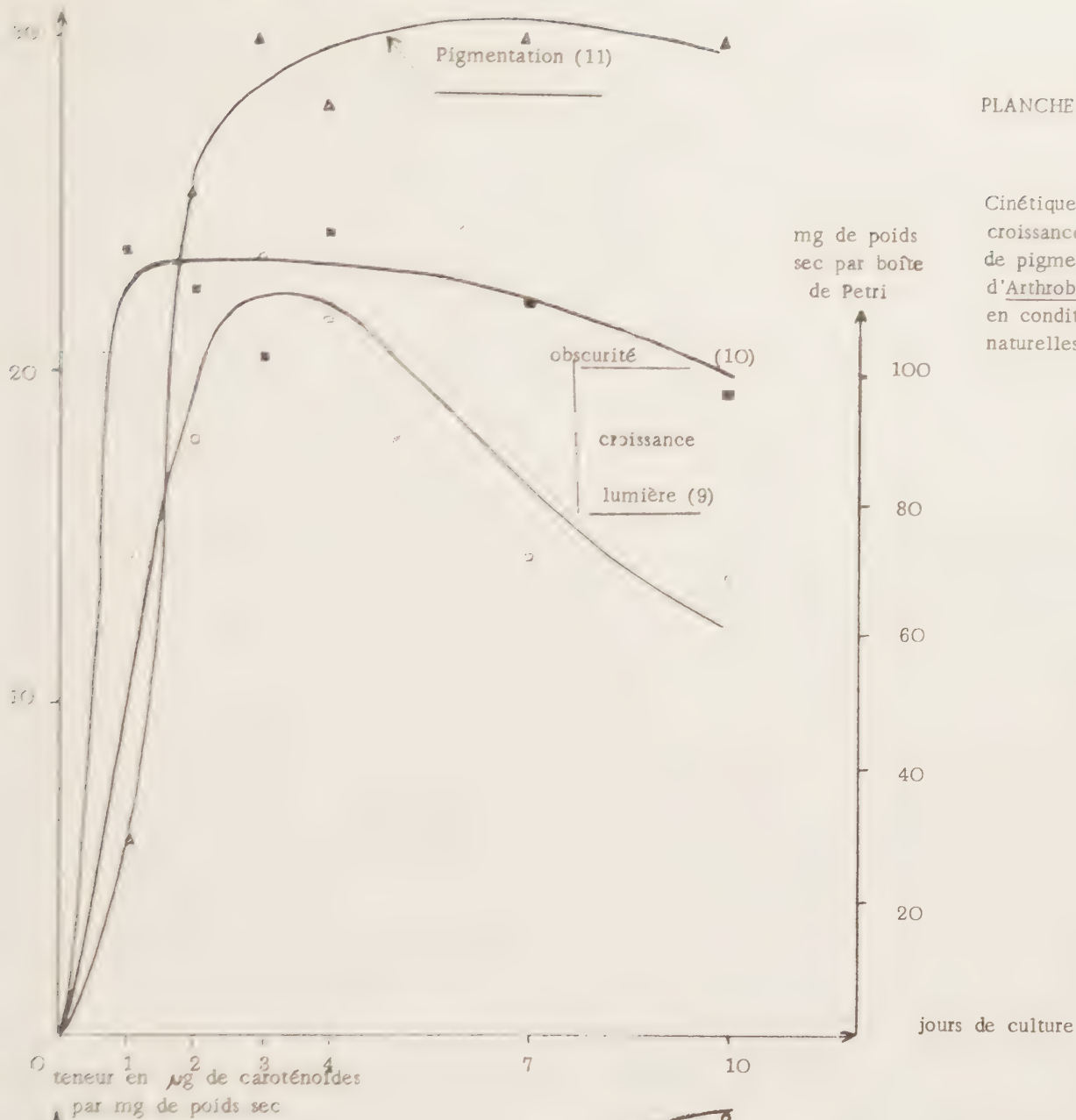
Le schéma représenté dans la planche 21 illustre le dispositif expérimental utilisé dans toutes les expériences décrites ci-dessous : le projecteur de diapositives, équipé d'une

μg de caroténoïdes par boîte de Pétri

PLANCHE 17

Cinétiques de croissance et de pigmentation d'*Arthrobacter* sp. en conditions naturelles

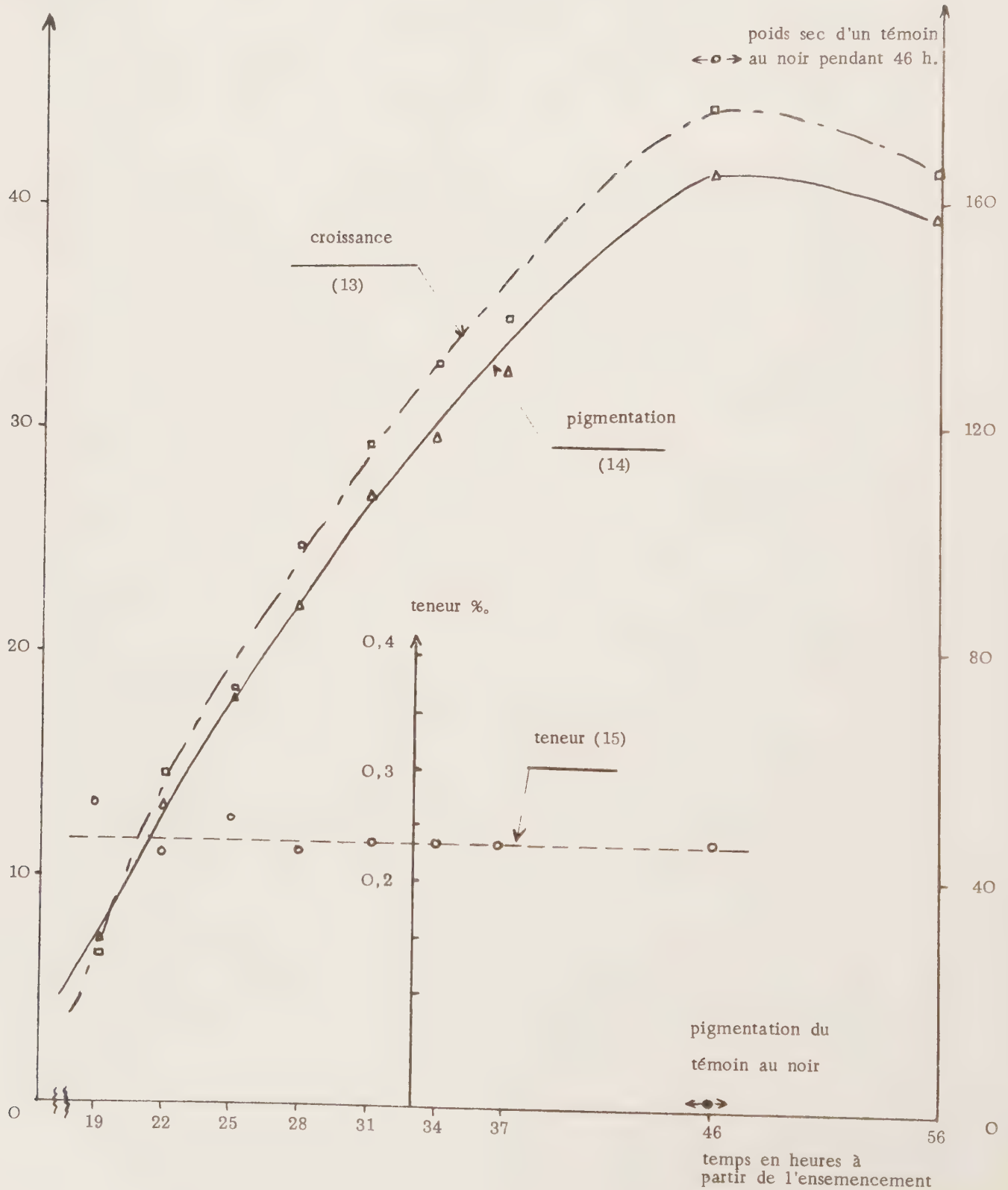
mg de poids sec par boîte de Petri



Cinétiques de croissance et de pigmentation
d'Arthrobacter sp. en conditions contrôlées

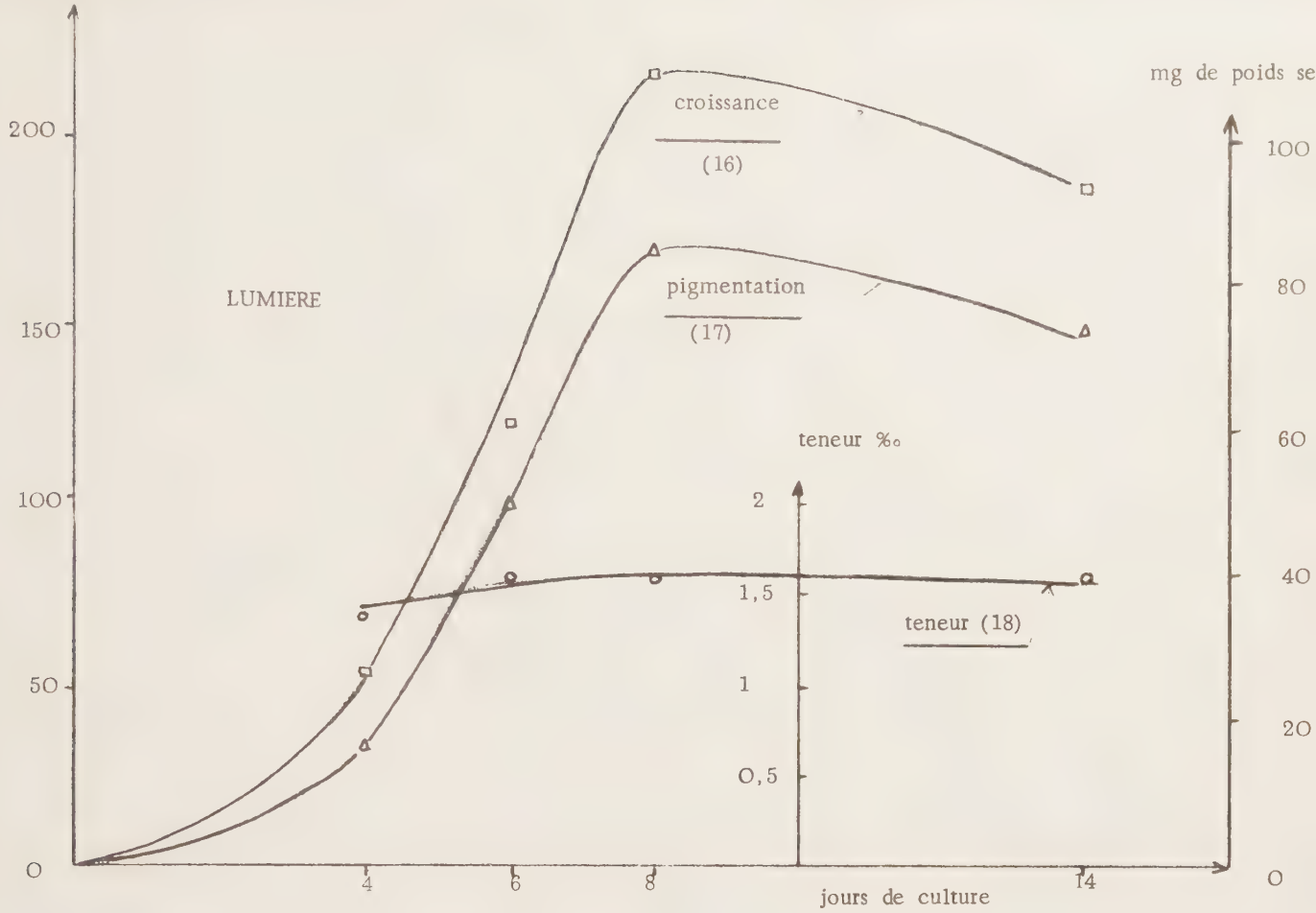
ug de caroténoïdes
par boîte de Petri

mg de poids s

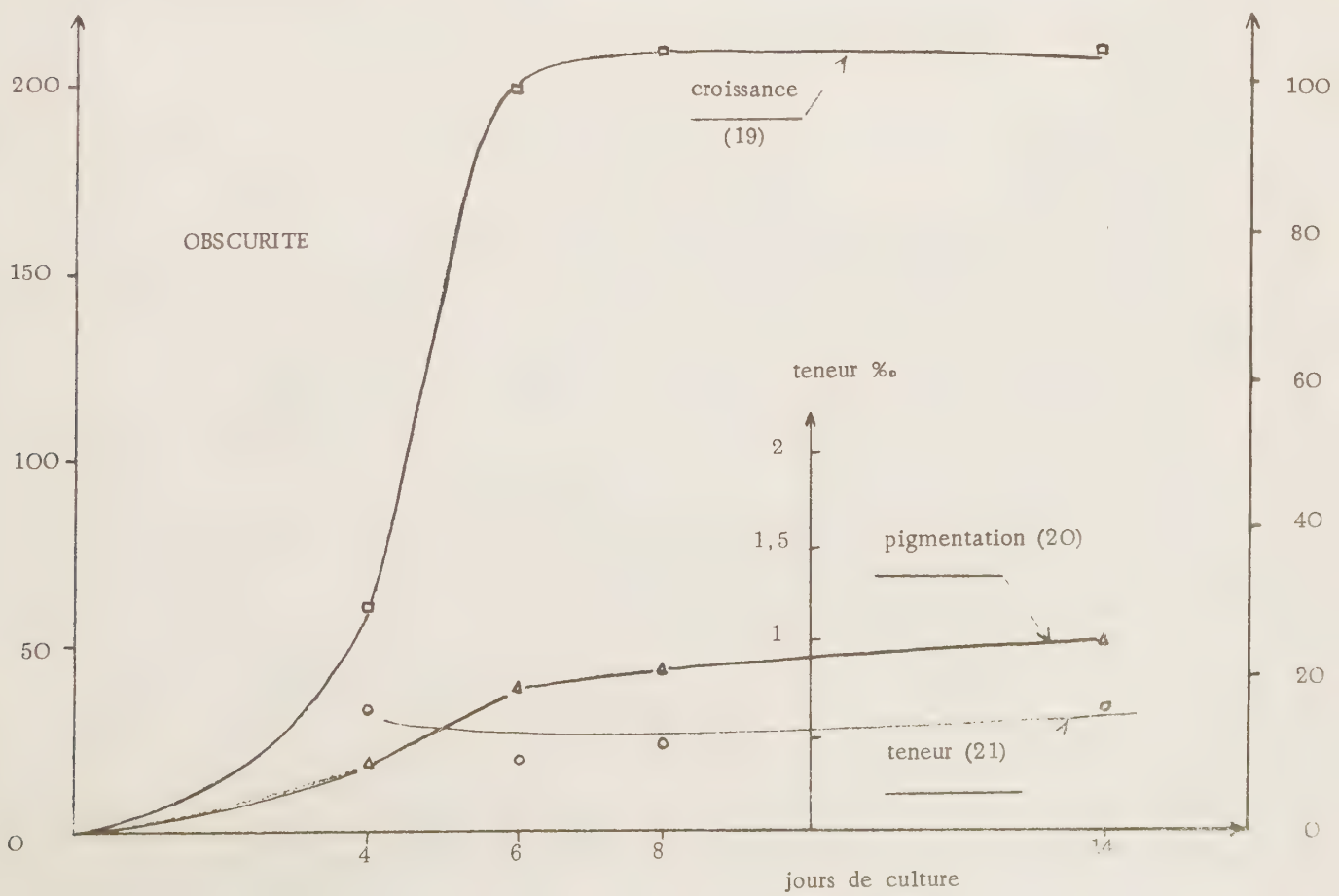


Cinétiques de croissance et de pigmentation
d'*Arthrobacter glacialis* en conditions contrôlées

μg de caroténoïdes par
boîte de Petri



μg de caroténoïdes par boîtes de Petri



Cinétiques de croissance et de pigmentation
de Sporidiobolus johnsonii en conditions
contrôlées

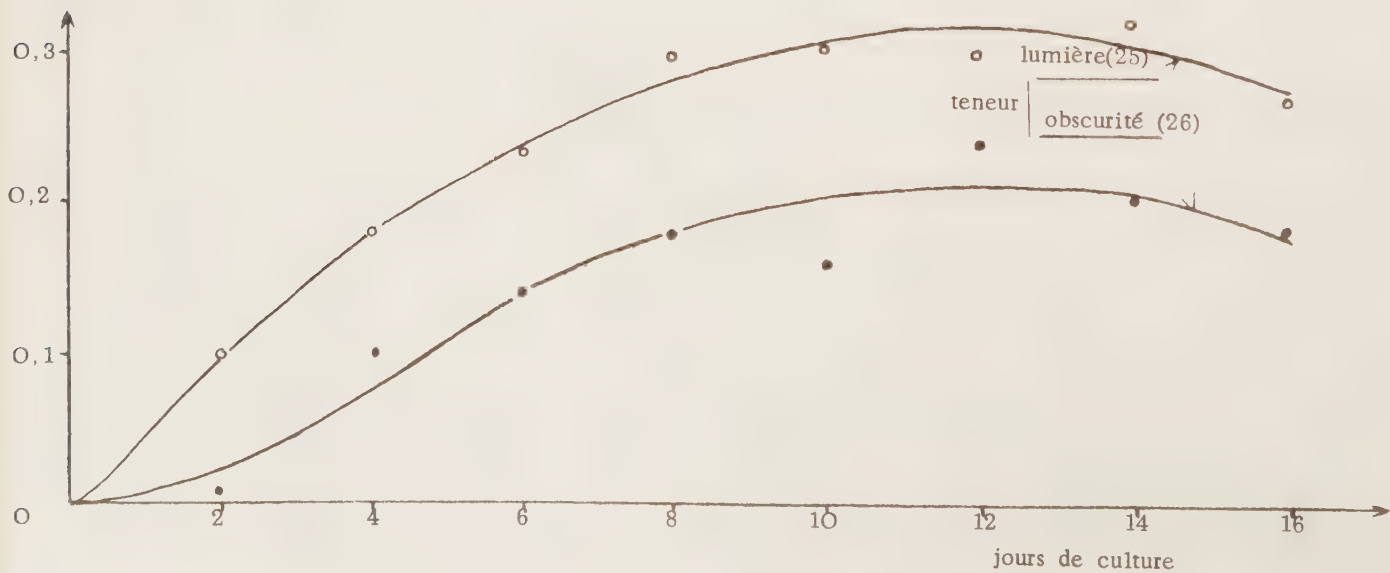
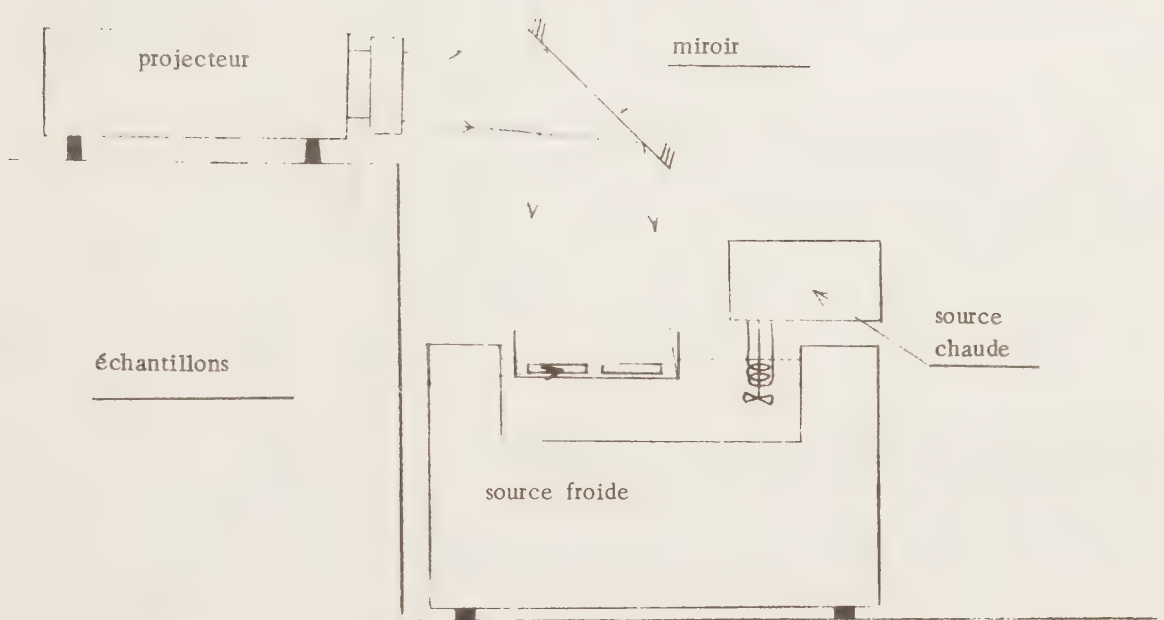


PLANCHE 21

FIGURE 6

Dispositif expérimental pour les expériences en conditions contrôlées (à l'exception des spectres d'action)



TABEAU X

Influence de la nature de la source lumineuse sur la caroténogénèse d'*Arthrobacter* sp., pour des valeurs saturantes de la lumination.

Source lumineuse	essai n°	Eclairement en W/m ²	µg de caroténofides par boîte de Petri
Tubes fluorescents	1	10	26
	2		22
	3		25
lampe quartz-iode	4	20	23
	5	10	27
	6	5	25

PLANCHE 22

TABEAU XI

Effet de mémoire et efficacité
de l'illumination
(*Arthrobacter* sp.)

essai n°	éclairage en W/m^2	durée et mode d'éclairage	lumination $10^3 \times \text{J/m}^2$	pigmentation relative en %
1	10	10 h. (toute la deuxième période)	360	100
2	10	1 h. (au début de la deuxième période)	36	29
3	10	50 min. en dix fractions de 5 min. espacées par 55 min. d'obscurité	30	60
4	10	10 min. en dix fractions de 1 min. espacées par 59 min. d'obscurité	6	33

lampe quartz-iode (24 V, 250 W) et de son objectif de projection usuel (focale de 85 mm), constitue la source lumineuse. Le faisceau, dévié par un miroir incliné à 45° par rapport à l'horizontale, vient éclairer des boîtes de Petri ; celles-ci, au nombre de quatre, sont placées dans un récipient métallique, à l'intérieur du bain-marie, où la source chaude, seule utilisée dans le cas présent, fixe la température à + 25° C, avec une précision d'1/2 degré. L'éclairement, modifié par le moyen des filtres neutres que constituent les plaques photographiques (voir dans la 2ème partie, chap. II, C/, 1°) est mesuré à l'aide de la thermopile Kipp et Zonen, avec une précision moyenne de 2 %.

Comme nous avons utilisé deux types différents de source lumineuse (lampe quartz-iode, Sylvania 24 V, 250 W, et tubes fluorescents, Claude U 40 RS, 1 lumière du jour de luxe et 1 blanc Z), nous avons vérifié que la composition spectrale de la source n'avait pas d'influence sur la quantité de pigments formés (sans nous préoccuper de l'aspect qualitatif de la pigmentation) (tableau X de la planche 21).

De plus, les éclaircissements continus que reçoivent les témoins dans les différents essais de sensibilité de la bactérie à la lumière (5, 10 et 20 W/m²) conduisent à une même caroténogénèse, comme le montre le tableau X de la planche 21. La moyenne des quantités de caroténoïdes produits dans les différents essais est de 25 g par boîte de Pétri.

Pour les essais, l'illumination est donnée selon un mode spécial, qui consiste à fractionner le stimulus lumineux en jouant sur l'effet de mémoire mis en évidence par MATHEWS (1963) chez Mycobacterium marinum ; cet effet existe également chez Arthrobacter sp., comme le montre l'expérience suivante : quatre lots de deux boîtes de Pétri reçoivent des luminations variées, l'éclairement est constant, seules changent la durée et la façon de donner cet éclaircissement (tableau XI, planche 22).

A la lecture des résultats, apparaît la notion d'efficacité de l'illumination : les lots 2 et 3, qui ont reçu des luminations voisines, montrent une variation de 1 à 2 dans la synthèse des caroténoïdes, alors que cette dernière est presque équivalente entre les lots 2 et 4, bien que le lot 4 ait reçu une lumenation six fois plus faible que le lot 2.

L'effet de mémoire peut s'expliquer de la façon suivante : au début de la période d'illumination, le poids sec de la colonie est environ au tiers de sa valeur maximale, atteinte 24 h. après, et dans le lot 2, l'induction n'aura lieu que pour la masse bactérienne présente ; c'est ce que traduit la pigmentation relative de ce lot, soit 29 %. L'effet du stimulus lumineux ne persiste donc pas après la fin de l'illumination, et cette conclusion rejoint l'observation rapportée plus haut de la stabilité de la teneur en caroténoïdes durant la phase stationnaire de croissance d'Arthrobacter sp.

Si le mécanisme de synthèse des carotènes, proposé par BATRA et STORMS chez Mycobacterium marinum, se trouve vérifié chez Arthrobacter sp., ce qui est probable, ces faits s'expliquent par une grande vitesse de disparition des différents éléments de la chaîne de synthèse (depuis le métabolite inducteur jusqu'aux enzymes), conjuguée à un phénomène de dilution en période de croissance active, la substance d'une cellule mère se partageant entre deux cellules filles. Au contraire, en fractionnant l'illumination, ces deux phénomènes seront compensés par la réapparition régulière des produits dégradés.

Cette technique devrait même permettre, en observant à quelle périodicité de l'illumination correspond la plus forte pigmentation relative, avec une lumenation suboptimale, de connaître approximativement le "turn-over" de l'ensemble de la chaîne de synthèse, pour une vitesse de croissance déterminée. Il est par ailleurs possible de connaître ainsi les luminations réellement exigées pour induire la pigmentation et de tracer des courbes de sensibilité à la lumière.

Ces courbes sont établies d'après la pigmentation relative, telle que nous l'avons définie (3ème partie, chapitre I, B/, 3°), en fonction de la durée d'illumination (planche 23,

courbes 27 et 28) ou de la lumination (planche 24, courbe 29).

Les courbes 27 et 28 montrent que la saturation de la pigmentation est atteinte plus vite avec l'éclairement le plus fort (la valeur lue sur l'échelle des temps est la durée totale de l'éclairement dans la période des dix heures d'illumination). De plus, le temps nécessaire pour obtenir une réponse caroténogénétique saturante, avec l'éclairement de 10 W/m^2 , est environ le tiers de la durée totale de l'étape d'illumination.

Dans la planche 24, nous avons porté le logarithme de la différence à 100 de la pigmentation relative de l'essai en fonction de la lumination : un tel mode d'expression, employé par RILLING dès 1963, facilite l'interprétation des résultats :

- il permet de montrer que l'effet photobiologique est une fonction logarithmique de la lumination. L'abscisse à l'origine donne la valeur théorique de la lumination capable de provoquer une pigmentation maximale au stade physiologique considéré ; dans le cas présent, cette valeur de la lumination est de $204 \times 10^3 \text{ J/m}^2$.

- Si la loi de réciprocité est vérifiée, la droite obtenue doit être la même quelle que soit la valeur de l'éclairement, les autres conditions étant constantes. Les différents paramètres qui définissent la courbe sont des caractéristiques de la souche étudiée, et peuvent être utilisés pour définir sa sensibilité : en particulier, la pente de la droite ne dépend, dans les conditions fixées, que de la vitesse de croissance de la bactérie et de la quantité de lumière qu'elle exige pour réaliser la synthèse des caroténoïdes.

Dans le tableau suivant (planche 25, tableau XII), nous donnons les différents essais réalisés en vue de vérifier la loi de réciprocité. Nous avons utilisé trois niveaux d'éclairement avec des durées variées d'illumination : si les résultats obtenus avec les faibles valeurs d'éclairement montrent une certaine homogénéité, nous n'avons cependant pas un nombre suffisant de correspondances pour affirmer avec certitude que la loi de BUNSEN-ROSCOE est vérifiée chez *Arthrobacter sp.*, ce qui est pourtant probable si l'on admet que l'hétérogénéité des résultats provient de celle constatée sur la croissance des échantillons. Nous n'avons pu, faute de temps, recommencer cette expérience avec un nombre plus grand de déterminations.

B/ Les exigences qualitatives en lumière

Nous avons décrit dans notre deuxième partie, le dispositif simplifié qui va nous permettre de rechercher la sensibilité de quelques micro-organismes aux diverses longueurs d'onde du spectre visible (planche 15, figure 4). Toutefois, la recherche de la portion active du spectre au moyen de filtres colorés à large bande passante (transmission supérieure à 3 % sur 120 nm. en moyenne) précède la détermination du spectre d'action proprement dit.

1° Détermination de la portion active du spectre visible sur la pigmentogénèse d'*Arthrobacter sp.*

Elle sera faite de la manière suivante : trois boîtes de Pétri, obtenues comme il a été décrit précédemment, sont recouvertes chacune d'un filtre de gélatine et exposées à la lumière pendant 10 h., de telle sorte qu'elles reçoivent un éclairement constant de $1,8 \text{ W/m}^2$. Toutes les précautions sont prises pour que seule la lumière passant à travers le filtre coloré arrive à la surface de la colonie bactérienne. Pour chaque lot, correspondant à une couleur, trois témoins reçoivent pendant 10 h. un éclairement de 10 W/m^2 de deux tubes fluorescents. Les essais sont réalisés avec les trois filtres de gélatine décrits dans le tableau V (planche 10), avec, comme source lumineuse, le projecteur de diapositives. La pigmentation des trois essais est exprimée en pourcentage de celle des trois témoins ; les résultats sont rassemblés dans le tableau XIII (planche 26).

La portion rouge du spectre est presque totalement inactive (elle ne l'est cependant pas complètement par rapport au noir absolu). Par contre, les portions bleues et vertes du

Influence de la durée d'illumination
sur la caroténogénèse d'Arthrobacter sp.

Pigmentation relative

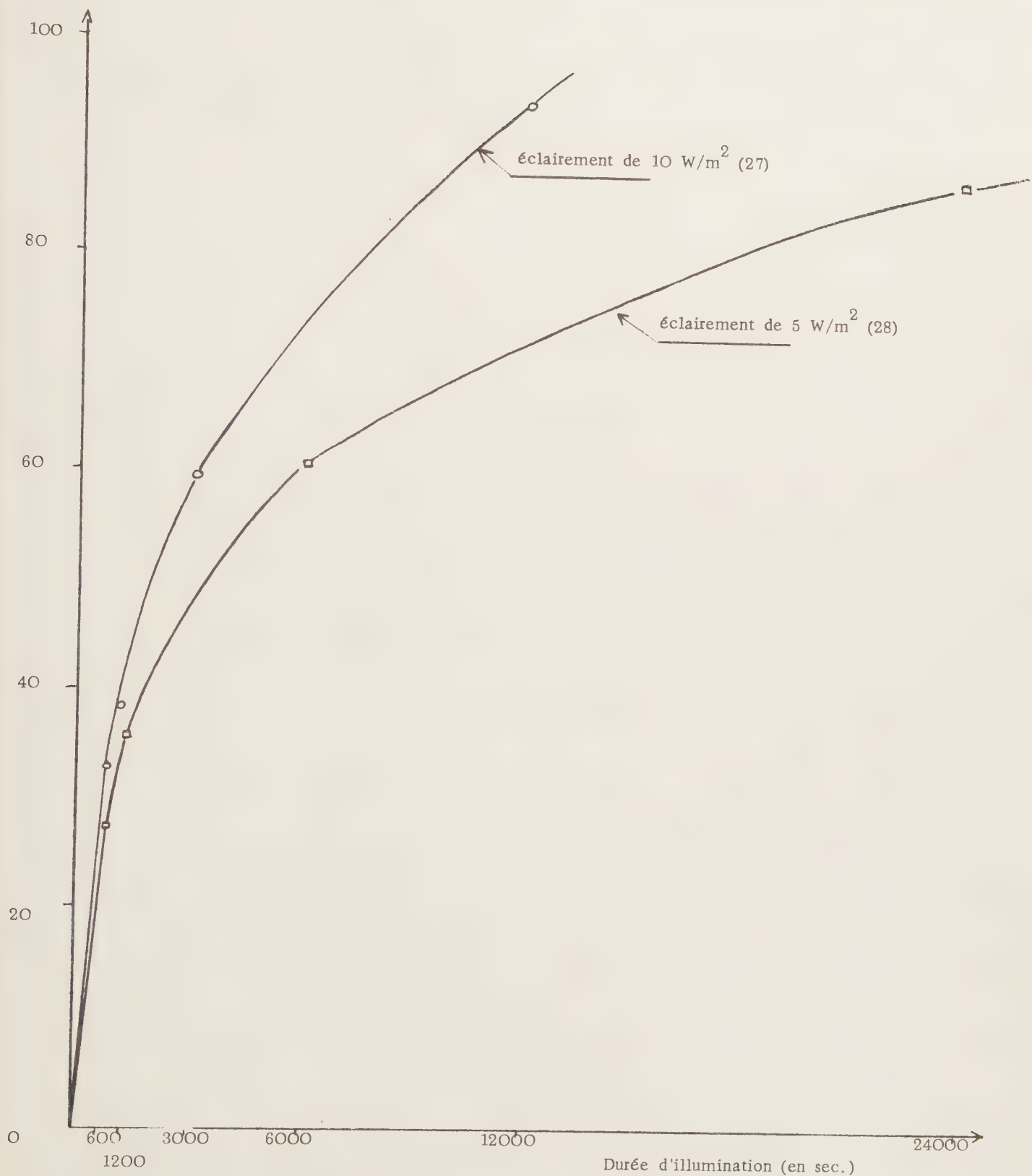


PLANCHE 24

log (100 - pigmentation relative en %)

Pigmentation relative en fonction
de la lamination chez Arthrobacter sp.
(courbe 29)



PLANCHE 25

TABEAU XII

Loi de réciprocité
(Arthrobacter sp.)

Lumination totale (10^3 J/m^2)	Eclairements énergétiques					
	20 W/m^2		10 W/m^2		5 W/m^2	
	10 illuminations d'une durée de : (sec.)	% de pigmen- tation relative	10 illuminations d'une durée de : (sec.)	% de pigmen- tation relative	10 illuminations d'une durée de : (sec.)	% de pigmen- tation relative
3	15	20			60	27,5
6			60	33	120	36
12			120	39		
30	150	55	300	60	600	61
120	600	64	1200	94	2400	87

TABLEAU XIII

Détermination de la portion active du spectre visible

Couleur du filtre de gélatine		Bleue (n° 64)	Verte (n° 56)	Rouge (n° 29)
pigmentation en μ g de caroté- noïdes par boîte de Petri	essai	21,6	22,2	1
	témoin en lumière blanche	24,2	25,9	25,0
pigmentation relative de l'essai		90 %	88 %	4 %

FIGURE 7

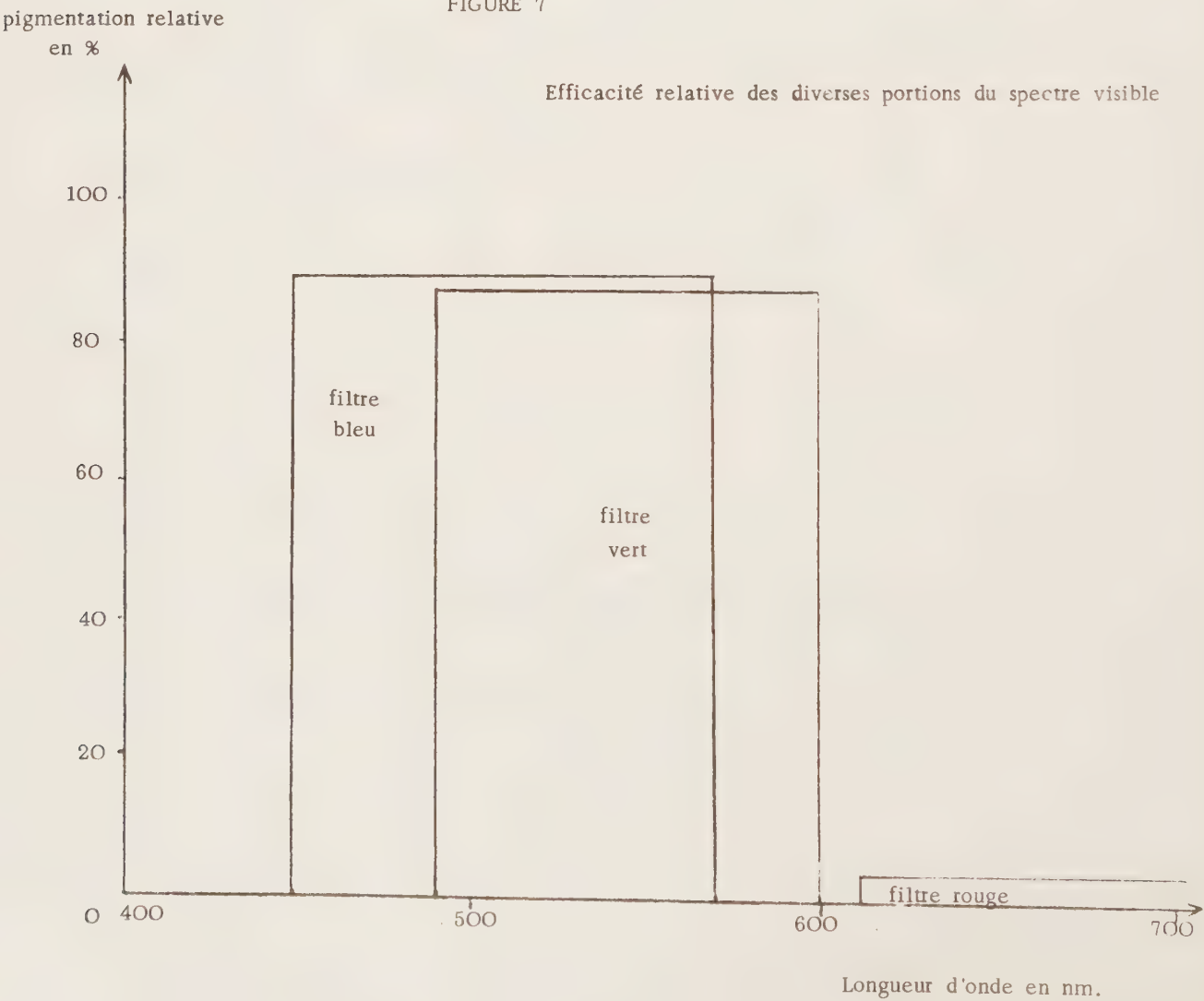
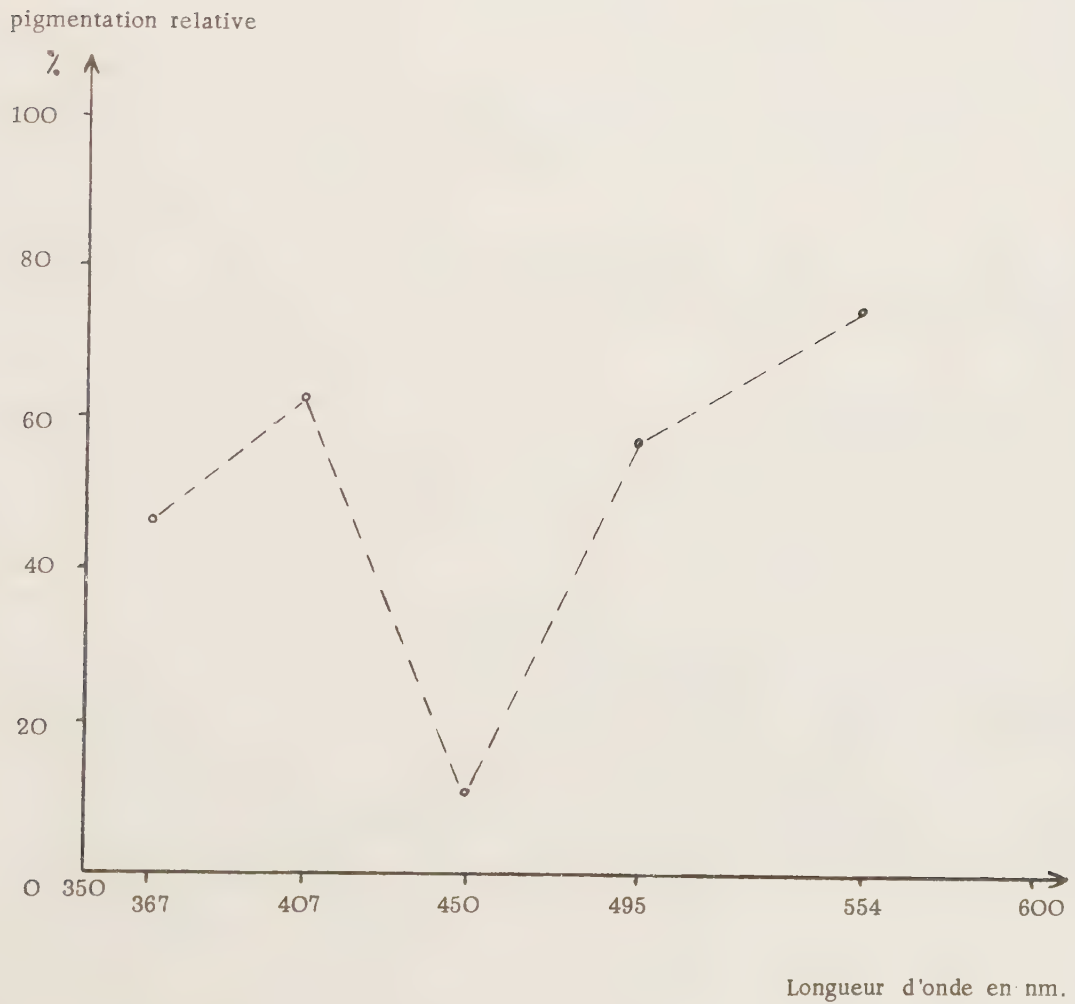


TABLEAU XIV

Détermination préliminaire de spectre d'action chez
Arthrobacter sp.

λ_1 du filtre interférentiel en nm. (cf. tableau V)	367	407	450	495	554
pigmentation relative de l'essai	46 %	64 %	10 %	56 %	74 %

FIGURE 8



spectre sont, chacune séparément, presque aussi actives que la lumière blanche, aux erreurs de dosage près (figure 7).

2° Tentative de détermination de spectre d'action

Nous utilisons les cinq filtres interférentiels, dont les caractéristiques sont données dans le tableau VI (planche 10), et dont les longueurs d'onde de transmission maximale sont respectivement 367, 407, 450, 495, et 554 nm., représentant le proche U.V., le bleu et le vert.

Dans le dispositif simplifié, chaque essai est placé dans la chambre d'irradiation, le filtre interférentiel remplaçant le hublot du couvercle : des filtres neutres, placés au-dessus du filtre interférentiel permettent de fixer l'éclairement à la valeur choisie. Tous les essais reçoivent pendant 10 h. un éclairement de $1,8 \text{ W/m}^2$ et les résultats sont exprimés en pourcentage de ceux de deux témoins qui ont reçu pendant la même durée, un éclairement saturant de 10 W/m^2 de lumière blanche. Pour les essais, des éclairagements supérieurs à $1,8 \text{ W/m}^2$ entraînent une saturation de la réponse caroténogénétique et la sensibilité de la bactérie à chaque longueur d'onde n'apparaît plus; nous préférons avoir pour témoins, des colonies dont la pigmentation soit maximale, donnant une référence physiologique plus stable.

Un fluide dont la température est fixée dans notre "élément thermique," détermine celle de la chambre d'irradiation, par circulation dans sa double enveloppe.

Arthrobacter sp. Les résultats, obtenus à la température de $+ 25^\circ \text{C}$, sont rassemblés dans le tableau XIV et la figure 8 de la planche 27.

Nous ne donnerons pas à ces résultats le titre de spectre d'action, mais plutôt celui d'essai préliminaire : en effet, cinq points ne suffisent pas à définir le photorécepteur et une détermination véritable exige une vingtaine de points, au moins, sur un intervalle spectral plus large (300 à 650 nm. environ). Il faudrait d'ailleurs, sur la position de chaque point, une précision supérieure à celle obtenue dans le cas présent (10 %).

Toutefois, les grandes lignes d'un spectre d'action peuvent être dégagées par cette technique :

- le photorécepteur ne peut en aucun cas être une flavo-protéine ou un caroténoïde : de tels composés ont leurs maximums d'absorption situés entre 420 et 480 nm. ; précisément, cette portion du spectre correspond à un minimum très net dans le cas présent (figure 8). Inversement, les maximums observés à 400 et 550 nm. correspondent aux minimums d'absorption des flavines et de bon nombre de caroténoïdes.
- les résultats obtenus seraient compatibles avec le spectre d'absorption d'une porphyrine, quant à la position des maximums (400 et 550 nm), sinon quant à leurs intensités respectives : en effet, pour les porphyrines libres, l'absorption dans la région dite "de Soret" (autour de 400 nm) est dix à trente fois plus intense que celle qui a lieu à 550 nm., selon le solvant dans lequel elles se trouvent dissoutes (SCHWART, BERG, BOSSENHEIMER et DINSMORE, 1962). Il est impossible d'écarter l'hypothèse d'un troisième type de photorécepteur ou de l'intervention de deux photorécepteurs concurrents.

Cependant, un argument vient renforcer l'idée d'un photorécepteur de type porphyrine ; de même que HOWES et BATRA (1970) ont caractérisé une porphyrine chez M. marinum, nous décrirons dans le paragraphe suivant comment nous avons mis en évidence un tel composé chez Arthrobacter sp. : il s'agirait de la coproporphyrine III, isolée en premier lieu de Corynebacterium diphtheriae (GRAY et HOLT, 1948) et qui semble être un pigment extra-cellulaire assez répandu chez les Corynébactériacées ; des porphyrines ont également été signalées chez des micro-organismes caroténogènes comme Micrococcus lysodeikticus (TOWNSLEY et NEILANDS, 1957), Rhodospirillum rubrum (LASCELLES, 1956) et Myxococcus xanthus (BURCHARD et HENDRICKS, 1969). Cependant la présence de la coproporphyrine III est également citée par MIDDLETON et GUNNER (1968) chez Arthrobacter globiformis, espèce non pigmentée.

Du point de vue biogénétique, l'apparition des porphyrines dans le milieu de culture d'Arthrobacter globiformis est liée à des conditions particulières de métabolisme (présence de sucres et d'éléments métalliques à l'état de traces, oxygénation faible) de sorte que les auteurs pensent à un mécanisme d'accumulation de la porphyrine à partir d'un précurseur, dont le devenir normal serait la transformation en cytochromes, composés à fonction biologique au contraire des porphyrines.

Il semble assez délicat de prendre position sur le rôle et l'importance biologique des porphyrines dans la réception du stimulus lumineux conduisant à la synthèse des caroténoïdes : nulle part, leur identification en tant que photorécepteurs n'est certaine et elles se rencontrent aussi bien chez les bactéries chlorophylliennes que non-chlorophylliennes et chez les bactéries capables ou non de caroténogénèse. Pour avoir la réponse, il faudrait s'intéresser non seulement à la présence ou à l'absence de ces composés, mais aussi à la chaîne biosynthétique de ces pigments extra-cellulaires, ce qui suppose une étude biogénétique extrêmement fine : si une porphyrine joue le rôle de photorécepteur, elle se trouve dans chaque cellule à une concentration très faible.

Pour le photobiologiste, le problème se complique encore, car il s'agit de trouver la forme native du photorécepteur : le composé qui s'accumule dans le milieu peut être un intermédiaire de la chaîne de synthèse du photorécepteur, et par ailleurs, in vivo, la porphyrine qui jouerait ce rôle, peut être libre ou liée, à une protéine par exemple (comme l'hème) ou seulement estérifiée par un alcool complexe comme le phytol (cas de la chlorophylle).

Arthrobacter glacialis : la tentative, menée à la température de + 10° C, n'a pas donné de résultats, par la faute d'une technique de culture imparfaitement mise au point.

Sporidiobolus johnsonii : deux essais, menés à la température de + 22° C, ont donné les résultats suivants :

- efficacité nulle de la radiation 554 nm.
- pour les quatre autres radiations, la pigmentation relative représente 90 % de la différence des teneurs à la lumière et à l'obscurité.

Dans la gamme étudiée, seules les radiations de longueur d'onde inférieure à 550 nm. seraient efficaces et l'on peut penser que dans les essais réalisés, l'énergie donnée (respectivement 2 et 4 fois plus faible que pour Arthrobacter sp.) conduit à une pigmentation saturante, ne permettant pas de mettre en évidence des différences de sensibilité aux diverses longueurs d'onde.

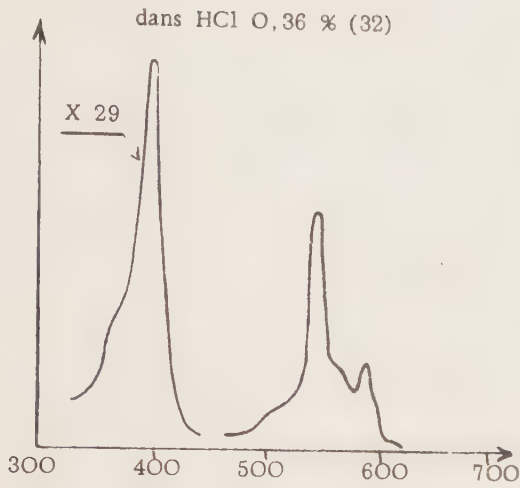
C/ Identification des porphyrines d'Arthrobacter sp.

Le mode opératoire que nous avons utilisé est celui décrit par MIDDLETON et GUNNER (1968) : dix erlens d'une centaine de cm³, contenant 30 cm³ de milieu de LOCHHEAD modifié, sont ensemencés par une préculture liquide réalisée sur le même milieu. Après cinq jours de croissance à + 20° C sur plateau faiblement agité, les bactéries sont séparées par centrifugation et le surnageant est affronté à un mélange d'acide acétique et d'acétate d'éthyle (1/3, V/V). Les porphyrines, à l'exception des uroporphyrines, passent dans la phase organique, qui est ensuite lavée par l'eau, l'acétate de sodium (solution aqueuse à 3 %) et l'eau. La phase organique est alors extraite par l'acide chlorhydrique à 15 % (P/V), puis transférée dans l'éther en ajustant le pH à 4, point isoélectrique des porphyrines, par la soude ou l'acétate de sodium : la phase étherée est lavée à l'eau et extraite par l'acide chlorhydrique 0,36 % ; seules les coporphyrines passent dans l'hydropase. Les protoporphyrines sont extraites par l'acide chlorhydrique à 10 %.

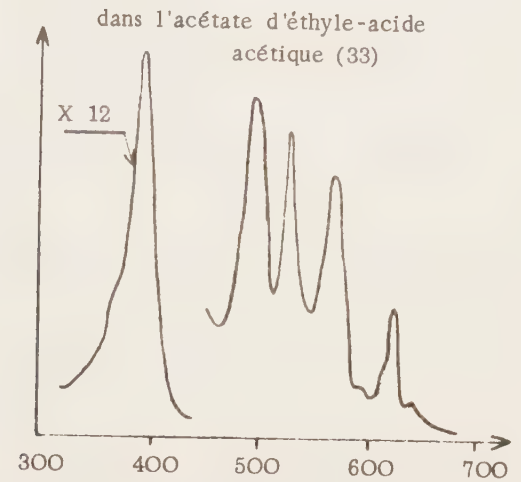
Pour Arthrobacter sp., l'extrait global dans l'acétate d'éthyle présente des maximums à 400, 500, 532, 572 et 627 nm., avec des épaulements à 408, 579, 602 et 620 nm. ;

Spectres des extraits bruts des pigments produits par Arthrobacter globiformis
d'après MIDDLETON et GUNNER (1968)

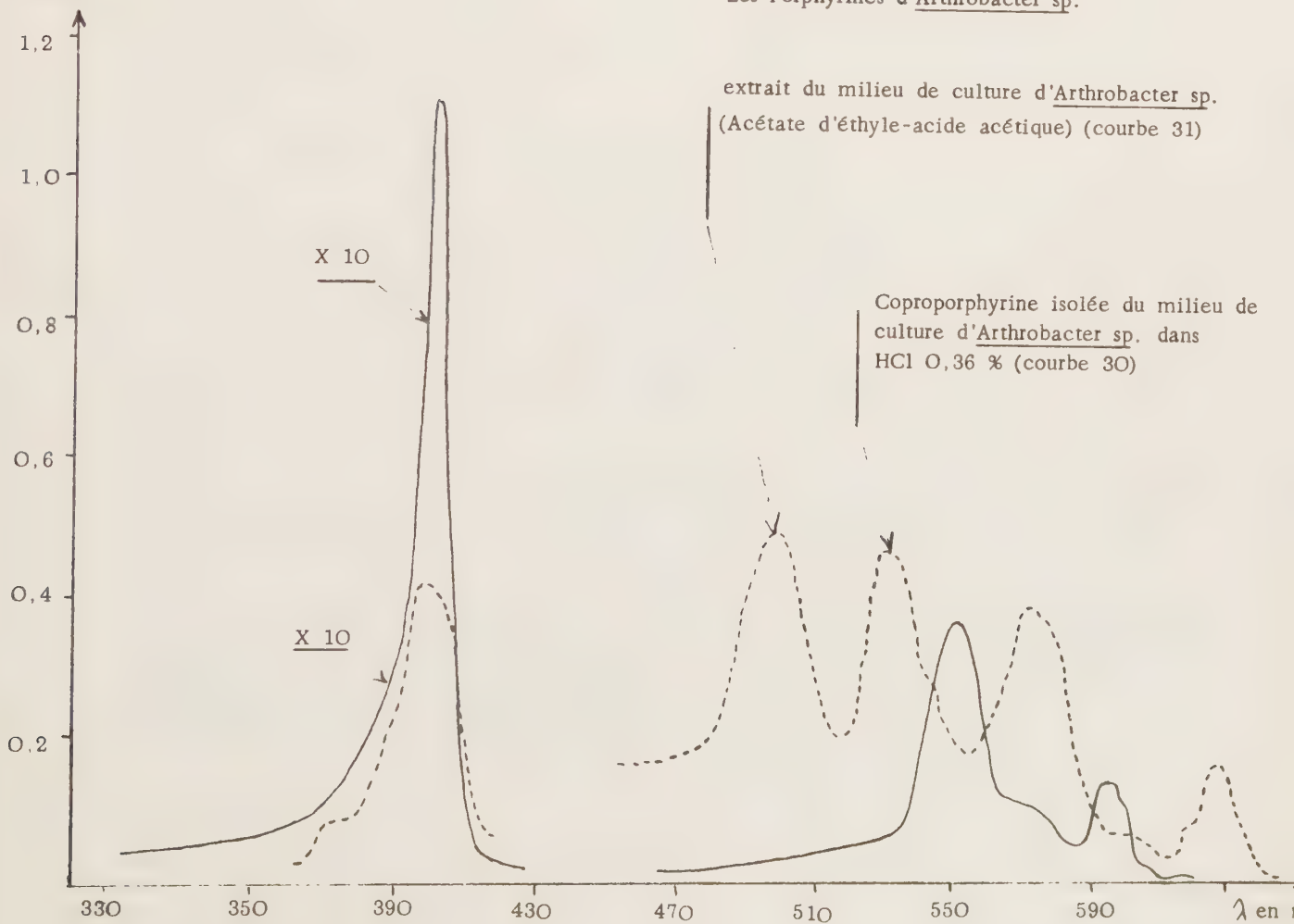
Densité optique



longueur d'onde en nm.



Densité optique



le pic à 400 nm. est dix fois plus intense que le pic à 500 nm.. Il ne s'agit pas d'une uroporphyrine (planche 28, courbe 31).

Dans la phase extraite de l'éther par l'acide chlorhydrique 0,36 %, les maximums se situent à 398, 551 et 595 nm. avec un épaulement à 572 nm., l'intensité du pic à 398 nm. étant trente fois supérieure à celle du pic à 551 nm.. Le spectre obtenu (courbe 30), montre une parfaite identité avec celui de la porphyrine d'Arthrobacter globiformis et avec celui de la coproporphyrine III isolée de Corynebacterium diphtheriae : bien que ce critère ne suffise pas à lui seul à assurer l'identité des pigments (une cochromatographie des esters obtenus avec chacun est nécessaire) nous pensons que la porphyrine isolée d'Arthrobacter sp., comme celle isolée d'A. globiformis, est la coproporphyrine III.

Il reste dans la phase organique un composé qui n'est pas extrait par l'acide chlorhydrique 15 % et qui présente des maximums d'absorption à 396, 526 et 564 nm.. Ce composé est probablement lui aussi une porphyrine.

D/ Inhibition et activation de la synthèse caroténoïdique chez Arthrobacter sp.

1° Inhibition par les hautes intensités lumineuses

Nous avons utilisé cet effet, mis en évidence par RILLING (1963) et décrit dans notre première partie, avec l'intention de vérifier la capacité de notre chambre d'irradiation à maintenir une atmosphère particulière.

La pigmentation d'une colonie ayant subi un éclaircissement de 400 W/m^2 sous atmosphère d'azote pendant 10 minutes, avant une illumination de dix heures en atmosphère normale avec un éclaircissement de 10 W/m^2 , est comparée à celle d'un témoin ayant subi le même traitement mais maintenu à l'obscurité pendant les dix minutes passées sous atmosphère d'azote. Le témoin produit $30,2 \mu\text{g}$ de carotènes et l'essai ayant subi la haute intensité $14,4$ seulement, montrant un pourcentage d'inhibition de 48 %.

2° Inhibition et activation par les facteurs chimiques

L'action d'un certain nombre de composés, connus pour bloquer la caroténogénèse des Champignons et des Bactéries a été étudiée qualitativement.

Afin de pouvoir séparer l'action sur la croissance de celle sur la pigmentation, les bactéries sont transférées stérilement, après 23 h. de croissance, à la surface de boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé vierge, auquel a été rajouté ou non l'inhibiteur ou l'activateur : les colonies transférées sont alors illuminées ou maintenues à l'obscurité pendant 10 h. et les caroténoïdes sont dosés 15 h. après la fin de l'illumination. Des témoins à la lumière ou à l'obscurité, ayant subi ou non le transfert, permettent d'affirmer que cette technique ne modifie pas la sensibilité des bactéries à la lumière.

Les inhibiteurs de la synthèse protéique bloquent effectivement la synthèse des caroténoïdes, par exemple le chloramphénicol à la concentration de $6 \times 10^{-3} \text{ g/l}$. La diphenylamine se révèle également un inhibiteur efficace de la caroténogénèse chez Arthrobacter sp. à la dose de $3 \times 10^{-6} \text{ g/l}$.

Par contre nous n'avons trouvé aucun composé capable de se substituer au facteur lumière pour induire la pigmentation à l'obscurité : ni le mercuribenzoate, actif chez Fusarium aqueductuum (RAU, 1967) et chez M. marinum (HOWES et BATRA, 1970), ni l'antimycine A, efficace chez le même Mycobacterium (BATRA, 1967). Ce dernier composé a été utilisé à trois concentrations différentes chez Arthrobacter sp. (0,25 ; 0,5 et $1 \times 10^{-7} \text{ g/l}$.); un tel comportement est à rapprocher de celui de Mycobacterium sp. (HOWES et BATRA, 1970).

RESUME

A la fin de cet exposé, et sous forme de conclusion, nous tenons à souligner quelques points, qui nous ont paru essentiels au long des différentes étapes de ce travail.

Dans une première partie, bibliographique, nous avons relaté un certain nombre de travaux concernant le déterminisme de la caroténogénèse de quelques micro-organismes, et exposé l'influence des facteurs physiques et chimiques, en insistant sur le rôle primordial de la lumière : cette dernière intervient, de toute évidence chez les micro-organismes photosensibles, pour déclencher le mécanisme qui conduit à la synthèse des caroténoïdes. Nous avons essayé de donner une idée des exigences tant qualitatives que quantitatives des espèces étudiées vis-à-vis de ce facteur.

Quant au mécanisme proprement dit, nous avons cité l'interprétation qu'en donnent BATRA et STORMS dès 1968 : il nous semble indispensable de souligner que, dans le schéma proposé, seule la partie "médiane", c'est à dire la régulation au niveau de l'A.D.N., est vraiment explicitée ; les aspects photochimique et enzymologique, qui constituent la première et la troisième partie de ce schéma, sont peu ou pas connus.

Nous avons exposé, dans une deuxième partie, comment réaliser un appareillage permettant une approche photobiologique du phénomène ; nous pensons avoir démontré qu'il est possible d'aborder ces problèmes sans un matériel complexe ni onéreux. Partant du principe que l'élément "source thermique" fait partie de l'équipement de base de tout laboratoire de Biologie et qu'il n'est pas spécifique d'une étude photobiologique, les seuls éléments coûteux du micro-irradiateur sont à notre avis, les filtres interférentiels et la chambre d'irradiation. Soulignons le fait que cette dernière est également prévue pour l'étude d'échantillons vivants de petite taille, autres que des cultures de micro-organismes.

Cet irradiateur spectral à température contrôlée, que nous appelons "micro-", non point tant pour ce qu'il peut contenir qu'en raison de ses dimensions, comparées à celles du Phytotron, a fait ses preuves puisque nous avons obtenu, grâce à lui, des résultats préliminaires à la détermination d'un spectre d'action. Mais il s'agit d'un prototype, et en tant que tel, ses avantages et ses inconvénients ne sont apparus qu'au fur et à mesure de l'expérimentation. Les inconvénients nous semblent être, d'une part la faible sensibilité de l'appareillage de mesure des éclairagements énergétiques, et, d'autre part, une homogénéité et un parallélisme insuffisants du faisceau lumineux dans le dispositif simplifié. Par contre, les avantages sont les suivants :

- contrôle de la température sur une gamme assez étendue pour des études physiologiques très diverses,
- contrôle qualitatif et quantitatif du facteur lumière,
- possibilité d'un travail en conditions stériles et du choix de l'atmosphère environnant l'échantillon,
- souplesse et facilité d'utilisation de l'ensemble de l'appareillage.

Dans une troisième partie, enfin, nous avons réalisé, grâce au micro-irradiateur, une revue assez complète des divers aspects du déterminisme de la caroténogénèse chez quelques

micro-organismes : plutôt que d'approfondir un point particulier par une expérimentation originale, nous avons voulu vérifier les possibilités de l'appareillage et mettre en évidence ses défauts comme ses qualités ; aussi cette partie expérimentale n'apporte pas d'éléments nouveaux à la connaissance du mécanisme étudié. Elle nous a permis toutefois de montrer que la souche la plus utilisée, Arthrobacter sp., présente le même type de réactions aux stimulus lumineux que les espèces de Mycobacterium étudiées par MATHEWS, RILLING et BATRA (dont elle est très proche du point de vue taxinomique) et que Fusarium aquaeductuum, champignon étudié par RAU et ses collaborateurs (dont elle est séparée par un véritable "fossé" systématique).

La détermination préliminaire du spectre d'action de la lumière sur la caroténogénèse d'Arthrobacter sp., appuyée par la mise en évidence, dans le milieu de culture de cette bactérie, de porphyrines nous donne à penser que, comme chez Myxococcus xanthus et Mycobacterium marinum, le photorécepteur peut être un pigment à noyau tétrapyrrolique.

Du point de vue pratique, la culture en milieu solide, qui a permis d'éprouver le micro-irradiateur, est adaptée à une étude à court terme, par sa facilité relative de mise en oeuvre : pour une étude physiologique fine, à long terme, la culture en milieu liquide serait préférable, bien qu'elle exige un matériel plus complexe et plus coûteux, parce qu'elle donne au protocole expérimental une rigueur bien supérieure ; cette rigueur nous semble indispensable pour des expériences exigeant une grande précision, comme la vérification de la loi BUNSEN-ROSCOE, ou la constitution d'un spectre d'action détaillé.

Enfin, cette étude nous a fait toucher du doigt l'importance du travail qui reste à accomplir dans le domaine de la photochimie, pour arriver à une connaissance détaillée des phénomènes de la photoréception biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- BATRA P.P. - (1967 a) Induction of carotenoid synthesis by antimycin A in the dark in Mycobacterium marinum. Biochim. Biophys. Acta. 148, 315-316.
- BATRA P.P. - (1967 b) Induction of carotenoid synthesis by antimycin A in the absence of light in Mycobacterium marinum. J. Biol. Chem., 242, 5630-5635.
- BATRA P.P., GLEASON R.M., Jr et J. JENKINS - (1969) Mechanism of photo-induced and antimycin A-induced carotenoid synthesis in Mycobacterium marinum. Requirements for carotenogenesis and further evidence for protein synthesis following induction. Biochim. Biophys. Acta. 177, 124-135.
- BATRA P.P. et RILLING H.C. - (1964) On the mechanism of photo-induced carotenoid synthesis : aspects of the photo-inductive reaction. Arch. Biochem., 107, 485-492.
- BATRA P.P. et STORMS L. - (1968) Mechanism of photo-induced and antimycin A-induced carotenoid synthesis in Mycobacterium marinum : effect of proflavine. Biochem. and Biophys. research communications, 33, 820-827.
- BURCHARD R.P. et DWORKIN M. - (1966) Light induced lysis and carotenogenesis in Myxococcus xanthus. J. Bacteriol., 91, 535-545.
- BURCHARD R.P., GORDON S.A. et DWORKIN M. - (1966) Action spectrum for the photolysis of Myxococcus xanthus. J. Bacteriol., 91, 896-897.
- BURCHARD R.P. et HENDRICKS S.B. - (1969) Action spectrum for carotenogenesis in Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 97, 1165.
- CANTINO E.C. et HORENSTEIN E.A. - (1959) The stimulatory effect of light upon growth and carbon dioxide in Blastocladiella. III Further studies in vitro and in vivo. Physiol. Plant. Danem., 12, 251-263.
- CARLILE M.J et FRIEND J. - (1956) Carotenoids and reproduction in Pyronema confluens. Nature 178, 369-370.
- CODNER R.C. et POLATT B.C. - (1959) Light-induced production of carotenoids by Cephalosporia. Nature Suppl., 184, 741-742.
- CURRY C.M. et GRUEN H.E. - (1959) Action spectra for the positive and negative phototropism of Phycomyces sporangiophores. Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 797-804.
- DELBRUCK M. et SHROPSHIRE W., Jr. - (1960) Action and transmission spectra of Phycomyces. Plant Physiol., 35, 194-204.
- EBERHARD D., RAU W. et ZEHENDER C. - (1961) Über den Einfluß des Lichts auf die Carotinoïd-bildung von Fusarium aquaeductuum. Planta, 56, 302-308.
- FIASSON J.L. - (1967) Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. Les caroténoïdes de Sporidiolobus johnsonii Nyland. C.R. Acad. Sc. Paris, 264, 2744-2745.
- GARTON G.A., GOODWIN T.W. et LISINSKY W. - (1951) Studies in Carotenogenesis. I General conditions governing β -carotene synthesis by the fungus Phycomyces blakesleeanas. Biochem. J., 48, 154-163.
- GRAY C.H. et HOLT L.B. - (1948) The isolation of coproporphyrin III from Corynebacterium diphtheriae culture filtrates. Biochem. J., 43, 191-193.
- HEBERT T.T. et KELMAN A. - (1958) Factors influencing the germination of resting sporangia of Physoderma maydis. Phytopathology, 48, 102-106.

- HELLER - (1969) Biologie végétale, nutrition et métabolisme, 456-457, Masson Ed., Paris.
- HOWES C.D. et BATRA P.P. - (1970) Mechanism of photo-induced carotenoid synthesis : further studies on the action spectrum, other aspects of carotenogenesis. Archiv. of Biochem. and Biophys., 137, 175-180.
- INGOLD C.T. - (1958) On light-stimulated spore discharge in Sordaria. Ann. Bot. G.B., 22, 129-135.
- LASCELLES J. - (1956) The synthesis of porphyrine and bacteriochlorophyll by cell suspension of Rhodospseudomonas spheroides. Biochem. J., 62, 78-93.
- MANACHERE G. - (1969) Recherches physiologiques sur la fructification de Coprinus congregatus Bull. ex Fr. : action de la lumière ; rythme de production des carpophores. Thèse Sciences Lyon.
- MATHEWS M.M. - (1963) Studies on the localisation, function and formation of the carotenoid pigments of a strain of Mycobacterium marinum. Photochem. Photobiol., 2, 1-8.
- MIDDLETON K. et GUNNER H.B. - (1968) - Porphyrin production by Arthrobacter globiformis. Canadian J. of Microbiol., 14, 1095-1103.
- MOIROUD A. et GOUNOT A.M. - (1969) Sur une bactérie psychrophile obligatoire isolée de limons glaciaires. C.R. Acad. Sc. Paris, 269, 2150-2152.
- MULDER E.G. et ANTHEUNISSE J. - (1963) Morphologie, physiologie et écologie des Arthrobacter. Ann. Inst. Pasteur, 105, 46.
- MULDER E.G. et Coll. - (1966) The relationship between Brevibacterium linens and the bacteria of the genus Arthrobacter. J. of Applied Bacteriol., 29, 44-71.
- NYLAND - (1949) Studies on some unusual heterobasidiomycetes from Whashington State. Mycologia 41, 686-701.
- PAGE R.M. - (1952) The effect of nutrition on growth and sporulation of Pilobolus. Am. J. Botany 39, 731-739.
- RAU W. - (1962) Über den Einfluß der temperatur auf die lichtabhängige Carotinoïdbildung von Fusarium aquaeductuum. Planta, 59, 123-127.
- (1967 a) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoïd synthese. I Das Wirkungsspektrum von Fusarium aquaeductuum. Planta, 72, 14-28.
- (1967 b) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoïdsynthese. II Ersatz der Lichtinduktion durch Mercuribenzoat. Planta, 74, 263-277.
- (1969) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoïdsynthese. IV Die rolle des Sauerstoffs bei der Lichtinduktion. Planta, 84, 30-42.
- RAU W., LINDEMANN I. et RAU-HUND A. - (1968) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoïdsynthese. III Die Farbstoffbildung von Neurospora crassa in Submerskultur. Planta, 80, 309-316.
- REID - (1957) Excited states in Chemistry and Biology, p. 104, Butterworths, Londres.
- RILLING H.C. - (1962) Photoinduction of carotenoid synthesis. Biochim. Biophys. Acta, 60, 548-556.
- (1964) On the mechanism of photoinduction of carotenoid synthesis. Biochim. Biophys. Acta, 79, 464-475.
- SCHNEIDERHORN G. - (1954) Das aktionspektrum der Wachstumsbeeinflussung durch licht bei Coprinus lagopus. Arch. Mikrobiol., 21, 230-236.
- SCHWARTZ S., BERG M.H., BOSSENHEIMER I. et DINSMORE H. - (1962) Methods Biochem. Anal., 10, 319 (cité in HOWES et BATRA, 1970).
- THEIMER R.R. et RAU W. - (1969) Mutants of Fusarium aquaeductuum lacking photoregulation of carotenoid synthesis. Biochim. Biophys. Acta, 177, 180-181.
- (1970) V. Light-dependent carotenoid synthesis, Planta, 92 (2), 129-137.
- TOWNSLEY P.M. et NEILANDS J.B. - (1957) The iron and porphyrin metabolism of Micrococcus lysodeikticus. J. Biol. Chem., 224, 695-705.

- TURIAN G. - (1950) Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille paratuberculeux. III Inhibition de la pigmentation par la diphénylamine. Helv. Chim. Acta, 33, 1988.
- TURIAN G. et SCHOPFER J.F. - (1960) Action anticaroténogène de la diphénylamine chez l'Algue Chlorella rubescens. Experientia, 16, 138.
- ZALOKAR M. - (1954) Studies on biosynthesis of carotenoids in Neurospora crassa. Arch. Biochim. Biophys., 50, 71-80.
- (1955) Biosynthesis of carotenoids in Neurospora. Action spectrum of photoactivation. Arch. Biochem. Biophys., 56, 318-325.
- (1957) Variations in the production of carotenoids in Neurospora. Arch. Biochem. Biophys., 70, 561-567.
- WOLKEN et JEROME J. - (1969) Microspectrophotometry and the photoreceptor of Phycomyces blakesleeanus. J. Cell. Biol. 43, 354-360.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : Exposé bibliographique sur le déterminisme exogène de la caroténogénèse chez les micro-organismes.

Chapitre I

Rôle des facteurs autres que la lumière dans le déterminisme de la caroténogénèse.....	11
A/ Les conclusions essentielles de ZALOKAR.....	11
B/ Les facteurs de milieu autres que la lumière.....	11
1° Influence de la température.....	12
2° Influence du pH sur la pigmentation de deux espèces de <u>Mycobacterium</u>	12
3° Rôle de l'oxygène.....	12
4° Les inhibiteurs de la caroténogénèse.....	13
5° Les composants du milieu de croissance.....	14

Chapitre II

Le rôle de la lumière dans la caroténogénèse des micro-organismes.....	15
A/ Les différents types d'exigences en lumière.....	16
1° Exigence partielle	
2° Exigence absolue	
3° Influence inhibitrice	
B/ Les exigences quantitatives en lumière.....	16
C/ Les exigences qualitatives en lumière : spectres d'action.....	18
1° Le principe de la mesure des spectres d'action.....	18
2° Exemples d'interprétation.....	19
a/ <u>Mycobacterium</u> sp.	20
b/ <u>M. marinum</u>	20
D/ Les inducteurs chimiques, substituts du facteur lumière.....	21

DEUXIEME PARTIE : Technologie.

Chapitre I

Elément "source thermique".....	29
A/ Source froide.....	29
B/ Source chaude.....	30
C/ Schémas de fonctionnement.....	30
D/ Exemples.....	31

Chapitre II

Elément "source lumineuse".....	33
A/ L'appareil et ses accessoires.....	33

B/ La mesure des grandeurs lumineuses.....	34
1° Les unités d'éclairement.....	34
2° La thermopile.....	34
a/ La sensibilité spectrale de la thermopile.....	35
b/ La sensibilité du galvanomètre.....	36
3° Quelques exemples de sources lumineuses et d'instruments de mesure.....	36
C/ Modifications apportées à l'appareil de série.....	37
1° Contrôle quantitatif de lumière.....	37
2° Contrôle qualitatif de lumière.....	38
3° L'optique.....	38
4° Le problème de l'énergie à la limite de l'ultra-violet.....	39

Chapitre III

Elément d'irradiation.....	41
----------------------------	----

Devis de l'ensemble de l'appareillage.....	42
--	----

TROISIEME PARTIE : Essais du micro-illuminateur spectral.

Etude de la photosensibilité de la pigmentation chez Arthrobacter sp.

Chapitre I

Les techniques d'expérimentation.....	47
---------------------------------------	----

A/ Le choix du micro-organisme.....	47
-------------------------------------	----

 1° Sporidiobolus johnsonii

 2° Arthrobacter glacialis

 3° Arthrobacter sp.

B/ Les techniques de culture.....	48
-----------------------------------	----

 1° Le choix du mode de culture.....
 48 |

 2° Les milieux utilisés.....
 48 |

 3° Déroulement du processus expérimental.....
 50 |

Chapitre II

Les résultats.....	53
--------------------	----

A/ Les exigences quantitatives en lumière.....	53
--	----

 1° Cinétiques de croissance et de pigmentation.....
 53 |

 2° Détermination de la sensibilité à la lumière.....
 54 |

B/ Les exigences qualitatives en lumière.....	56
---	----

 1° Détermination de la portion active du spectre.....
 56 |

 2° Tentative de détermination de spectre d'action.....
 57 |

C/ Identification des porphyrines d' <u>Arthrobacter sp.</u>	58
--	----

D/ Inhibition et activation de la caroténogénèse.....	59
---	----

 1° Inhibition par les hautes intensités lumineuses.....
 59 |

 2° Inhibition et activation par les facteurs chimiques.....
 59 |

RESUME.....	61
-------------	----

BIBLIOGRAPHIE.....	63
--------------------	----

TABLE DES MATIERES.....	67
-------------------------	----

Vu
Les Membres du Jury,

R. KUHNER
Ph. LEBRETON
A. M. GOUNOT
R. BERNARD

Vu et approuvé
Le Directeur de l'U.E.R. des Sciences
de la Nature

L. DAVID

Vu et accordé le permis d'imprimer
LYON, le 15 juin 1971
Le Président de l'Université Claude Bernard,

J. BOIDIN

